

AUTOREFERAT

Dr n. med. w zakresie biologii medycznej
Katarzyna Marchlewska

Zakład Endokrynologii Płodności
Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności
Wydział Lekarski
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, marzec 2017

Imię i Nazwisko: Katarzyna Marchlewska (do roku 1998 Katarzyna Jabłońska)

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

18.06.1997 r. - magister biologii (specjalizacja biochemia), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Łódzki, tytuł pracy magisterskiej: „Badanie specyficzności określonych metod oznaczania białka w stosunku do różnych białek”, promotor – prof. dr hab. Alojzy Zgirski.

05.10.2004 r. - doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, tytuł rozprawy doktorskiej „Wpływ tarczycy na dojrzewanie gonady męskiej”. Obrona z wyróżnieniem. Promotor – prof. dr hab. n. med. Krzysztof Kula, recenzenci – prof. dr hab. Barbara Bilińska, Uniwersytet Jagielloński, prof. dr hab. n. med. Andrzej Lewiński, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

04.07.2015 r. - podyplomowe studia z analityki medycznej na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie. Uzyskanie prawa wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego nr 15239.

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

1997-2000 – młodszy asystent kliniczny, Samodzielna Pracownia Andrologii i Endokrynologii Płodności, Szpital Kliniczny nr 3 im. Dr Seweryna Sterlinga w Łodzi

2000-2004 – słuchacz (stypendysta) Stacjonarnego Studium Doktoranckiego, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2004-2006 – asystent posiadający stopień doktora, Zakład Andrologii i Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2006-2009 – adiunkt posiadający stopień doktora, Zakład Andrologii, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2009-nadal – adiunkt posiadający stopień doktora, Zakład Endokrynologii Płodności, Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

WPLYW TRIJODOTYRONINY ORAZ FOLIKULOTROPINY NA ZAPOCZĄTKOWANIE SPERMATOGENEZY I DOJRZEWANIE KOMÓREK SERTOLEGO SZCZURA ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM EKSPRESJI KONEKSYNY 43

b) autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:

Impact Factor oraz punkty MNiSW podane są z roku publikacji, liczba cytowań zgodnie z ISI Web of Science z lutego 2017 roku.

PRACE ORYGINALNE:

- 1. Marchlewska K,** Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Orkisz S, Słowikowska-Hilczler J. Triiodothyronine modulates initiation of spermatogenesis in rats depending on treatment timing and blood level of the hormone. *Mol Cell Endocrinol.* 2011, 341: 25-34
IF 2011=4,192; MNiSW 2011=30;
Liczba cytowań: 6; Liczba cytowań bez autocytowań: 4
- 2. Marchlewska K,** Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Słowikowska-Hilczler J. Role of FSH and triiodothyronine in Sertoli cell development expressed by formation of connexin 43-based gap junctions. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 2011, 315(6): 329-336
IF 2011=1,642; MNiSW 2011=30;
Liczba cytowań: 6; Liczba cytowań bez autocytowań: 4
- 3. Marchlewska K,** Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Kula W, Oszukowska E, Filipiak E, Moszura T, Słowikowska-Hilczler J. Maturational changes in connexin 43 expression in the seminiferous tubules may depend on thyroid hormone action. *Arch Med Sci.* 2013, 9(1): 139-145
IF 2013=1,89; MNiSW 2013=20;
Liczba cytowań: 0

4. **Marchlewska K.**, Słowikowska-Hilczer J, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Kula K. The long-term effects of FSH and triiodothyronine administration during the pubertal period on connexin 43 expression and spermatogenesis efficiency in adult rats. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 2015, 323(4): 256-265
IF 2015=1,349; MNiSW 2015=30;
Liczba cytowań: 0

ROZDZIAŁ W KSIĄŻCE:

5. **Marchlewska K.**, Słowikowska-Hilczer J., Walczak-Jędrzejowska R., Oszukowska E., Filipiak E., Kula K. 2013, Hormony gruczołu tarczowego a czynność jądra. w: Układ płciowy męski, Badania kliniczne i doświadczalne. Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, 310-315
IF 2013=0; 2016=0; MNiSW 2013=4; 2016=4
Liczba cytowań: 0

Sumaryczny Impact Factor prac zgłoszonych jako osiągnięcie **IF=8,950** z roku publikacji, a punktacja **MNiSW=114** z roku publikacji.

Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład w powstanie publikacji naukowych dołączono w załączniku 5.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Spermatogeneza to wieloetapowy proces, w którym z pierwotnych komórek plemnikotwórczych, spermatogonii, powstają dojrzałe gamety męskie, plemniki. Proces ten odbywa się w nabłonku plemnikotwórczym kanaliką krętego jądra w środowisku utworzonym przez somatyczne komórki kanaliką tzw. komórki Sertolego. Komórki te stanowią element strukturalny nabłonka plemnikotwórczego w jądrach, położone są przy błonie podstawnej kanaliką plemnikotwórczego, ale ich cytoplazma sięga aż do światła kanaliką. Charakterystyczne w ich budowie są nisze cytoplazmatyczne, w których zlokalizowane są komórki płciowe. Prawidłowa czynność komórek Sertoliego jest niezbędna dla przebiegu procesu spermatogenezy. Pełnią one funkcję podporową, odżywczą

i regulacyjną w stosunku do komórek spermatogenezy. Spermatogeneza zapoczątkowana jest w okresie dojrzewania płciowego lub jak w przypadku szczura zaraz po urodzeniu. Proces ten, dzięki namnażaniu i samoodnowie spermatogonii, trwa do końca życia u wszystkich znanych gatunków. Czynniki odpowiedzialnymi za regulację spermatogenezy są przysadkowy hormon folikulotropowy – folikulotropina (FSH, ang. *Follicle Stimulating Hormone*) oraz testosteron wydzielany przez komórki Leydiga w jądrze. Zarówno FSH, jak i testosteron działają za pośrednictwem komórek Sertolego. Komórki plemnikotwórcze nie mają własnych receptorów dla tych hormonów. Badania eksperymentalne dowodzą, że udział w regulacji inicjacji procesu spermatogenezy ma gruczoł tarczowy. Również moje badania, których efektem była rozprawa doktorska potwierdzają znaczenie trijodotyroniny w rozwoju gonad u szczura.

Po porodzie ilość mRNA dla receptora FSH w komórkach Sertolego wzrasta aż do dnia 7., pozostaje na mniej więcej stałym poziomie pomiędzy 10-20. dniem życia, i ulega dramatycznemu zmniejszeniu około 40. dnia życia [1]. Ten początkowy wzrost jest związany zarówno ze wzrostem liczby receptorów przypadających na jedną komórkę Sertolego, jak i z podziałami komórek Sertolego (ok. 14. dnia życia). Następujące po tym zmniejszenie ekspresji receptora dla FSH związane jest prawdopodobnie z pojawieniem się dużej ilości spermatocytów i spermatyd, czemu towarzyszy wzrost masy jąder. Natomiast ekspresja mRNA dla receptorów FSH wydaje się być porównywalna zarówno u dojrzałych, jak i niedojrzałych zwierząt [2]. Poziomy FSH we krwi szczura w okresie okołoporodowym (5. dzień życia) są wysokie, ale w ciągu kilku dni ulegają znacznemu obniżeniu [3, 4]. Około 12. doby życia następuje ponowny wzrost poziomu FSH. Osiąga on maksimum w okresie pomiędzy 25-35. dniem życia szczura, przewyższając wartości wykrywane we krwi dojrzałych zwierząt. Poziom krążącego FSH ulega obniżeniu około 50. doby życia szczura, kiedy to dochodzi do skompletowania pierwszego cyklu spermatogenezy i w nabłonku plemnikotwórczym pojawiają się pierwsze plemniki [5].

Działanie hormonu tarczycy w jądrze ludzkim oraz u szczura odbywa się poprzez specyficzny receptor jądrowy TR kodowany przez dwa geny *Thra* i *Thrb*. Wyróżniono jego izoformy $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$, których ekspresja jest zależna tkankowo i różna na różnych etapach rozwoju organizmu. Izoformy TR $\alpha 2$, $\alpha 3$ nie wiążą się do hormonu tarczycy prawdopodobnie pełnią funkcje modulatorowe. Ekspresja aktywnego receptora TR $\alpha 1$ w jądrze wydaje się być najistotniejsza. Ogranicza się w tym okresie do komórek Sertolego [6, 7]. Jest ona największa pod koniec okresu płodowego i krótko po urodzeniu do 5. doby,

potem obserwuje się jego obniżoną ekspresję aż do 20. dnia życia. Po tym okresie spada do poziomu minimalnego ale jest obecna nawet u zwierząt dorosłych.

Obecność aktywnego receptora dla T3 stwierdzono również w komórkach płciowych, komórkach okołokanalikowych i Leydiga. Odkryto tu występowanie aktywnej izoformy TR β 1, a także wykazano aktywność tych receptorów u dorosłych osobników, chociaż ich ekspresja była znacznie mniejsza niż w okresie okołoporodowym [8, 9]. Zapoczątkowanie spermatogenezy u szczura następuje tuż po urodzeniu. Wtedy płodowe komórki płciowe (germinalne) tzw. gonocyty, ponownie rozpoczynają namnażanie i około 5. dnia życia, różnicują się do pierwszych spermatogonii. Spermatogonie proliferują przez co ich pula podlega samoodnowie, jednocześnie przekłada się to na wielkość ich populacji i zapewnia ciągłość spermatogenezy. Namnażanie i samoodnowa spermatogonii są krytyczne dla ilościowego aspektu spermatogenezy w ciągu całego życia. Pierwsze spermatocyty w stadium preleptotenu pierwszego podziału mejotycznego, zwane także spermatocytami spoczynkowymi, pojawiają się w kanaliku plemnikotwórczym 9. dnia życia szczura. Około 15. dnia pojawiają się pierwsze spermatocyty w kolejnym stadium podziału mejotycznego, stadium pachytenu. Pierwsze plemniki pojawiają się w jądrze szczura już około 45. dnia życia. Komórki Sertolego, które rozpoczęły namnażanie jeszcze w okresie życia płodowego, kontynuują mitozy przez około dwa tygodnie po urodzeniu, następnie dojrzewają czynnościowo, a ich główną rolą staje się utrzymanie środowiska dla przebiegu spermatogenezy. Aby ten warunek mógł być spełniony, konieczna jest prawidłowa ekspresja receptorów dla czynników regulacyjnych i wytworzenie sieci połączeń międzykomórkowych niezbędnych dla komunikacji pomiędzy zarówno samymi komórkami Sertoliego jak i między komórkami Sertoliego i komórkami płciowymi. Zakończenie podziałów komórek Sertolego występuje około 15. dnia życia i łączy się z powstaniem ich stałej, niezmiennej liczbowo populacji. Decyduje to o końcowej objętości jąder i liczbie wytwarzanych plemników. Jedna komórka Sertolego wspiera bowiem określoną liczbę komórek plemnikotwórczych.

Mechanizm, na drodze którego T3 reguluje proces proliferacji komórek Sertolego, nie jest do końca wyjaśniony. Możliwe jest, że działanie to odbywa się przy udziale dwóch inhibitorów kinaz cyklinozależnych p27^{Kip1} i p21^{Cip1}. Są to białka regulacyjne cyklu komórkowego obecne w różnych typach komórek [10, 11]. Zwiększona ekspresja jednego z nich lub obu wywołuje zahamowanie procesu proliferacji, natomiast zmniejszona, przedłuża zdolność komórek do podziałów. Zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, wykazano, że T3 wywołuje ekspresję obu tych białek, natomiast hipotyreoza obniża poziom

białka p27^{Kip1} w komórkach Sertolego u szczura w okresie przeddojrzewaniowym [12, 13]. Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznych pozbawionych białka p27^{Kip1} lub p21^{Cip1} lub obu tych białek potwierdzają tę teorię. Zwierzęta te mają zwiększone gonady, większą całkowitą liczbę komórek Sertolego i dzienną produkcję plemników w porównaniu z grupą kontrolną [14].

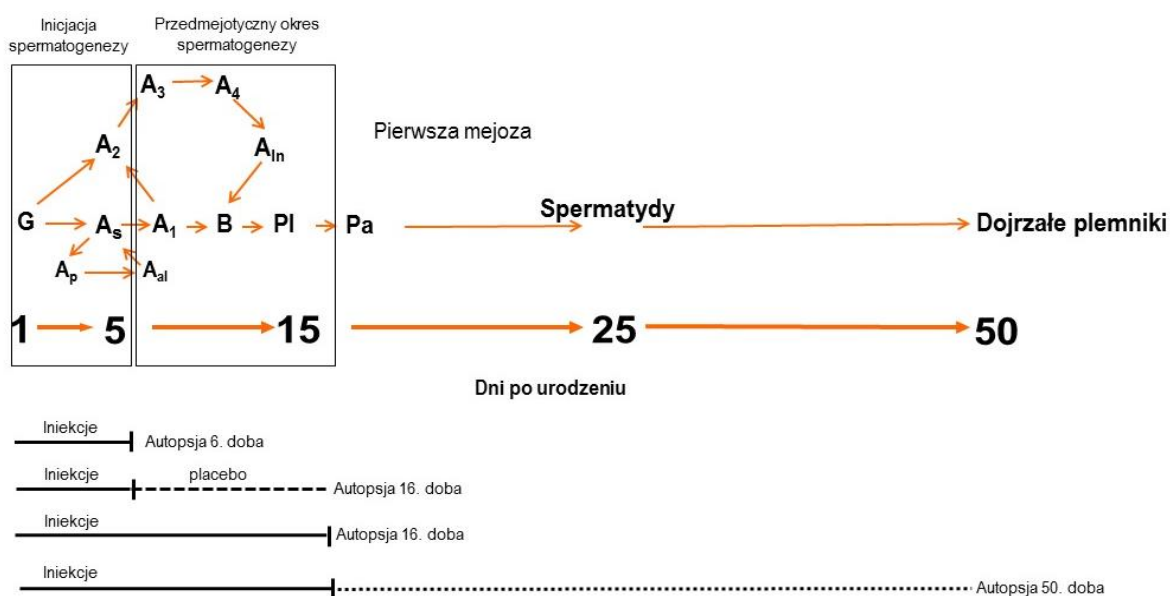
Drugim ważnym czynnikiem pośredniczącym w działaniu T3 jest koneksyna 43 (Cx43). Komórki Sertolego w organizmie dojrzałym tworzą ze sobą, ale również z sąsiadującymi komórkami płciowymi, sieć połączeń [15, 16]. Spośród różnych typów połączeń międzykomórkowych struktury tworzone w oparciu o Cx43 mają szczególne znaczenie. Tworzą rodzaj kanałów, które łączą sąsiadujące komórki i umożliwiają komunikację między nimi, co odgrywa kluczową rolę w procesach proliferacji i różnicowania [17, 18]. W komórkach jądra Cx43 jest białkiem najczęściej reprezentowanym w szczelinowych połączeniach międzykomórkowych (ang. *gap junction*). Hamujący wpływ T3 na proliferację komórek Sertolego jest związany ze wzrostem poziomu tego białka w jądrach w okresie przeddojrzewaniowym [19]. Próby wyhodowania myszy transgenicznych pozbawionych Cx43 wykazały, że brak tego białka daje efekt letalny, ale w ostatnich latach udało się wyhodować myszy pozbawione Cx43 tylko w komórkach Sertolego (SC-Cx43KO). Obserwowano u nich utrzymujący się aż do dojrzałości okres proliferacji i opóźnienie dojrzewania komórek Sertolego. Komórki plemnikotwórcze reprezentowały jedynie dzielące się wczesne spermatogonie. Dorosłe zwierzęta miały znacznie zredukowaną liczbę komórek płciowych i były nieplodne [20, 21].

Moje zainteresowania badawcze ukierunkowane były na poszerzenie wiedzy na temat roli T3 i FSH w regulacji zapoczątkowania spermatogenezy. Badałam wpływ tych hormonów na wzrost jądra, dojrzewanie i czynność komórek Sertolego oraz zmiany ekspresji Cx43. O ile rola FSH w regulacji hormonalnej gonad nigdy nie budziła wątpliwości, to w przypadku T3 przez wiele lat uważano, że jądra nie są wrażliwe na jej działanie [22, 23]. Obecnie pogląd na ten temat się zmienił. Wiadomo, że hormony tarczycy pełnią funkcję regulacyjną dla procesów wzrostu, różnicowania i metabolizmu niemal wszystkich tkanek. Uszkodzenie czynności gruczołu tarczowego odbija się negatywnie na funkcjonowaniu wielu organów. Gonada męska również zalicza się do tej grupy.

Trzy spośród czterech publikacji oryginalnych wchodzących w skład cyklu naukowego (publikacje nr 1, 2, 3) są wynikiem realizacji własnego projektu badawczego finansowanego w ramach środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, którego byłam kierownikiem (tzw. Praca własna Uniwersytetu Medycznego; załącznik 4, poz. II I, 13)

Modele badawcze

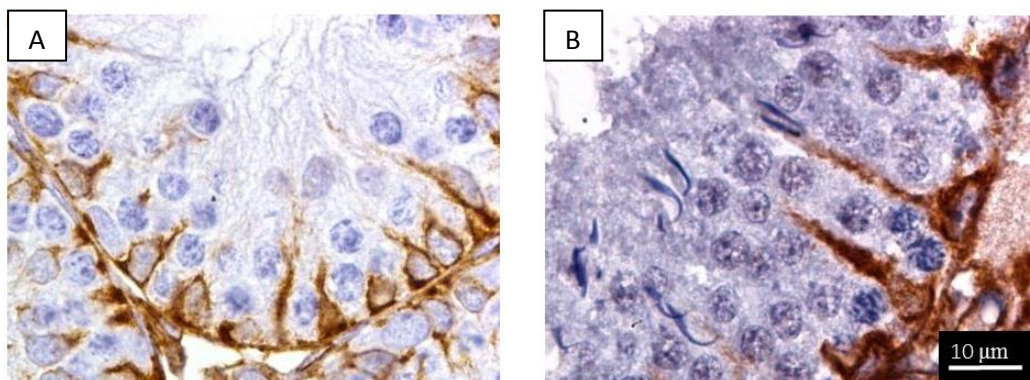
W pracach zgłoszonych jako osiągnięcie naukowe wykorzystywałam model doświadczalny z zastosowaniem noworodków samców szczura białego rasy Wistar. Szczur jest dogodnym zwierzęcym modelem doświadczalnym do badania czynności osi podwzgórze-przysadka-gonada, a tym samym mechanizmów regulujących dojrzewanie płciowe i proces spermatogenezy. Wzrasta on szybko i nie wykazuje okresów obniżonej płodności. Spermatogeneza u szczura, tzw. pierwsza spermatogeneza, rozpoczyna się już w 5. dobie życia, a kończy w 50. dobie powstaniem pierwszych plemników. W okresie od 1. do 5. doby życia gonocyty, pierwotne komórki płciowe, namnażają się i pod koniec tego okresu przekształcają w pierwsze spermatogonie typu A. Okres ten można określić jako inicjacja pierwszej spermatogenezy. Od 6. doby życia rozpoczyna się właściwa spermatogeneza, polegająca na intensywnej proliferacji i różnicowaniu komórek płciowych. Następnie w 15. dobie życia kończy się etap przedmeiotyczny tego procesu i rozpoczyna się pierwszy podział redukcyjny (mejoza) komórek płciowych. Okres pomiędzy 5. i 15. dobą jest więc kluczowy dla końcowej ilości komórek płciowych (Rycina 1). Mechanizmy kontrolujące dojrzewanie płciowe są mechanizmami konserwatywnymi i nie różnią się zasadniczo u różnych gatunków ssaków. Tak więc, wiele z wyników doświadczeń uzyskanych na szczurach można z powodzeniem odnieść do człowieka.



Rycina 1. Schemat modelu doświadczalnego. Na rycinie wyodrębniono poszczególne okresy spermatogenezy, zaznaczono również różne sposoby podawania badanych hormonów. Szczegółowy opis zastosowanych doświadczeń jest opisany poniżej. G –

gonocyty, A – spermatogonie typu A, B - spermatogonie typu B, Pl – spermatocyty preleptotenu, Pa – spermatocyty pachytenu. Linia ciągła - okres podawania badanego hormonu, linia przerywana – okres podawania rozpuszczalników dla badanych hormonów, linia wykropkowana - okres bez ingerencji.

W czasie korespondującym z zapoczątkowaniem spermatogenezy zwierzęta poddawane były codziennym wstrzyknięciom preparatów hormonalnych: T3 oraz FSH. Odpowiednie grupy kontrolne otrzymywały codzienne iniekcje roztworów rozpuszczalników dla badanych hormonów (placebo). Doświadczenia prowadzono w okresie rozwoju spermatogonii tj. namnażania i różnicowania pierwszych spermatogonii, równoległym do ustanowienia niezmiennej, dojrzałej populacji komórek Sertolego w jądrze. Model ten opracowany został wcześniej w naszej jednostce, jednak w prezentowanych tu badaniach wprowadziłam w nim istotne innowacje. W celu określenia okresu receptywności na podawane hormony wprowadziłam grupę zwierząt, których gonady podlegały ocenie w 6. dobie życia co odpowiadało inicjacji procesu spermatogenezy. Dodałam również grupę zwierząt, które hodowane były do 50. doby życia, czyli do uzyskania dojrzałości płciowej, co pozwalało obserwować w dojrzałej gonadzie odległe efekty podawania hormonów w okresie zapoczątkowania spermatogenezy. Do badań wykorzystywałam metodę analizy morfometrycznej jądra, umożliwiającą ocenę całkowitej objętości i długości kanalików plemnikotwórczych w jądrze. Wykorzystałam morfologiczną ocenę dojrzałości czynnościowej komórek Sertolego, która jest wypadkową tworzenia połączeń barierowych między przylegającymi komórkami Sertolego i wydzielania przez nie płynu kanalikowego. Analiza obejmowała: częstość występowania światła kanalika, ocenę jego średnicy i powierzchni z wykorzystaniem komputerowego systemu do analizy obrazu. Wprowadziłam ocenę immunoekspresji Cx43, której zmiany lokalizacji w komórce wskazują na stopień dojrzewania czynnościowego komórek Sertolego, wytworzenie połączeń międzykomórkowych oraz zwytworzenie bariery krew-jądro. Wprowadziłam też immunohistochemiczną analizę ekspresji wimentyny jako markera komórek somatycznych do ich różnicowania z komórkami płciowymi w celu oceny efektywności czynności komórek Sertolego. Metoda ta zakłada, że każda komórka Sertolego podtrzymuje funkcję określonej liczby komórek spermatogenezy. Ocena stosunku liczbowego komórek podporowych do komórek germinalnych świadczy o wydolności komórek Sertolego do podtrzymywania procesu spermatogenezy (Rycina 2).



Rycina 2. Mikrofotografia przekrojów przez kanalik plemnikotwórczy w: A) 16. dobie życia i B) 50. dobie życia. Zastosowano reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałami przeciwko wimentynie (reakcja pozytywna - barwa brązowa). Białko to wykazuje ekspresję w cytoplazmie komórek somatycznych, co pozwala na zastosowanie go do różnicowania komórek Sertolego od komórek płciowych. Skala -10 µm

Do ilościowej analizy komórek Sertolego używałam metod stereometrycznych, co pozwoliło na ocenę ich populacji w całym jądrze. W celu analizy degeneracji komórek zastosowałam metodę z toluidyną blue, natomiast proliferację komórek Sertolego oceniałam przy zastosowaniu metody immunohistochemicznej z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko jądrowemu antygenowi proliferacji komórkowej (PCNA, ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*).

Publikacja nr 1

Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Orkisz S, Słowikowska-Hilczner J. *Triiodothyronine modulates initiation of spermatogenesis in rats depending on treatment timing and blood level of the hormone. Mol Cell Endocrinol. 2011, 341: 25-34*

Pierwsza publikacja, przedstawiona jako osiągnięcie miała na celu zbadanie wpływu podawania trijodotyroniny na gonadę szczura. Stanowi ona wprowadzenie, które ukierunkowuje na kolejne badania. Kluczowym osiągnięciem tych badań było znalezienie okresu najwyższej receptywności jądra na działanie hormonu tarczycy w okresie inicjacji spermatogenezy.

T3 podawana w krótkim okresie korespondującym z rozpoczęciem spermatogenezy znacząco wpływa na procesy różnicowania, proliferacji i degeneracji komórek oraz tempo dojrzewania gonady. Eksperyment prezentowany w pracy był złożony. Obejmował grupę zwierząt młodych 6-dniowych, które poddawane były stymulacji hormonalnej T3 od 1. do 5. doby życia, czyli w okresie kiedy pierwsza spermatogeneza się rozpoczyna, a także dwie eksperymentalne grupy hodowane do 16. doby życia, czyli okresu, gdy kończy się

przedmejotyczny etap spermatogenezy. Jest to pod względem ilościowym kluczowy etap rozwoju gonady. Grupy te różniły się okresem podawania hormonu tarczycy w sposób przejściowy, czyli od 1. do 5. doby życia lub w sposób ciągły od 1. do 15. doby życia (Tabela 1).

Tabela 1. Schemat podawania badanych hormonów. Codzienne iniekcje w objętości 0,1 ml: trijodotyronina - 100 µg/kg ciężaru ciała w 0,025M NaOH w roztworze soli fizjologicznej 0,15M NaCl; placebo - 0,025M NaOH w soli fizjologicznej 0,15M NaCl.

Substancja	Iniekcje	Autopsja
Placebo	1. – 5. doba życia	6. doba życia
Trijodotyronina	1. – 5. doba życia	6. doba życia
Placebo	1. – 15. doba życia	16. doba życia
Trijodotyronina	1. – 5. doba życia+ placebo: 10 dób	16. doba życia
Trijodotyronina	1. – 15. doba życia	16. doba życia

W omawianej pracy wykazałam, że podawanie T3 w krótkim okresie do 6. doby życia powoduje zwiększenie średnicy kanalików plemnikotwórczych, wzrost liczby komórek Sertolego i wcześniejsze pojawienie się spermatogonii typu A. Wpływ hipertyreozы obserwowany w obu grupach szczurów 16-dniowych, gdzie poziomy hormonu tarczycy we krwi były w różnym stopniu podwyższone spowodował przyspieszenie dojrzewania gonad wyrażone poprzez zwiększenie średnicy kanalików plemnikotwórczych, zahamowanie proliferacji komórek Sertolego i jednocześnie podjęcie przez nie czynności wydzielniczej obserwowanej jako wytworzenie światła kanalika. Przedwcześnie ustalona liczba komórek Sertolego była znamienne niższa niż w warunkach fizjologicznych, co wywołało w efekcie obniżenie liczby komórek płciowych w 16. dniu życia szczura.

Wyniki w obu eksperymentalnych grupach zwierząt starszych (16. doba) różnią się istotnie, gdy porównujemy stopień zaawansowania procesu spermatogenezy. Przejściowe wywołanie hipertyreozы w okresie inicjacji spermatogenezy czyli pomiędzy 1-5. dniem życia powoduje zwiększenie liczby komórek płciowych, takich jak spermatogonie typu B, spermatocyty preleptotenu i pachytenu w porównaniu z grupą kontrolną. Pozwala to przypuszczać, że stymulacja T3 w okresie inicjacji spermatogenezy, ale przed rozpoczęciem różnicowania komórek płciowych, daje pozytywny ilościowo efekt, jeśli chodzi o stopień zaawansowania spermatogenezy. Odwrotną sytuację obserwuje się po ciągłej stymulacji T3.

Wszystkie typy komórek płciowych właściwe dla tego okresu rozwojowego są znamienne mniej liczne. Dodatkowo w cytoplazmie komórek Sertolego obserwuje się wakuolizację, która może świadczyć o zmianach regresyjnych /degeneracyjnych będących efektem trwałej hipertyreozy.

Podsumowując, działanie T3 na gonadę szczura zależy od okresu życia, w jakim jest zastosowana i wyraża się poprzez szereg parametrów dojrzewania gonady.

Publikacja nr 2

Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Kula W, Oszukowska E, Filipiak E, Moszura T, Słowikowska-Hilczer J. Maturational changes in connexin 43 expression in the seminiferous tubules may depend on thyroid hormone action. Arch Med Sci. 2013, 9(1): 139-145

Druga z opisywanych w cyklu prac podejmuje temat dojrzewania kanalika plemnikotwórczego wyrażonego poprzez zmiany ekspresji Cx43. Białko to nazywane jest również Gjpl1 i jest najbardziej charakterystyczną dla jądra koneksyną. U zwierząt dojrzałych wchodzi w skład międzykomórkowych połączeń komunikacyjnych zwanych również połączeniami szczelinowymi (ang. *gap-junctions*). Połączenia szczelinowe pełnią istotną rolę w licznych procesach takich jak dojrzewanie, różnicowanie, proliferacja, również wpływają na metabolizm komórki i zmiany regeneracyjne, ale znany jest też ich udział w procesach nowotworowych. W jądrze połączenia tego typu są jednym z elementów bariery krew-jądro i łączą sąsiadujące komórki Sertolego. Obecne są również pomiędzy komórkami Leydiga, ale także komórkami Sertolego i komórkami płciowymi, umożliwiając synchronizację proliferacji i różnicowania komórek płciowych. U dorosłego szczura immunoekspresja Cx43 wykazuje zależność od stadium cyklu nabłonka plemnikotwórczego i najsilniejsza jest w stadiach I-VIII.

W celu oceny wpływu T3 na ekspresję Cx43 zastosowano schemat doświadczenia podobny jak w poprzedniej pracy z tą różnicą, że oceniano tylko starsze 16-dniowe szczury, u których zmiany w lokalizacji tego białka są specyficzne (Tabela 1). Dodatkowo w celu oceny stopnia zaawansowania zmian związanych z dojrzewaniem nabłonka plemnikotwórczego utworzono dodatkową grupę zwierząt hodowanych bez stymulacji hormonalnej do 50. doby czyli do okresu dorosłości. W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że pojawienie się immunoekspresji Cx43 w kanalikach zbiega się z procesem inicjacji spermatogenezy. Podczas dojrzewania gonady ekspresja białka jest najwyższa w części apikalnej i częściowo na brzegach komórek Sertolego. Obraz taki utrzymuje się

fizjologicznie od 14. do 18. doby życia, a następnie w 22. dobie immunoekspresję Cx43 obserwuje się w lateralnej części komórek i ostatecznie silna reakcja występuje w części podstawnej komórek Sertolego, co wskazuje na tworzenie się bariery krew-jądro.

W prezentowanym badaniu grupa zwierząt kontrolnych w 16. dobie życia wykazywała bardzo silną reakcję w obszarze apikalnym w 86% kanalików plemnikotwórczych. Pod wpływem przejściowego podawania T3 w okresie korespondującym z inicjacją spermatogenezy, to jest od 1. do 5. doby życia, w jądrze szczura, w 16. dobie życia nie obserwowano już immunoekspresji Cx43 w obszarze apikalnym, natomiast obecna była peryferycznie w cytoplazmie komórek Sertolego ale nie osiągając jeszcze lokalizacji związanej z barierą krew-jądro. W tej grupie stwierdzone były również inne zmiany typowe dla dojrzewających kanalików plemnikotwórczych, takie jak wzrost średnicy i wytworzenie światła kanalika. Wszystkie te cechy wskazują na przyspieszenie procesu dojrzewania gonady.

Grupa zwierząt eksperymentalnych poddana hipertyreozie przez cały okres przedmeiotyczny spermatogenezy, to jest od 1. do 15. doby życia, nie wykazywała ekspresji Cx43, ani w części apikalnej, ani lateralnej komórek Sertolego. Intensywność barwienia była słaba i zlokalizowana blisko części podstawnej komórek Sertolego, co wskazuje na zaawansowanie ich dojrzewania. Duża średnica kanalika i dobrze wykształcone światło mogło świadczyć o znacznym przyspieszeniu procesu dojrzewania, ale jednocześnie liczne wakuole i niska wysokość nabłonka plemnikotwórczego sugerowały raczej niekorzystny wpływ przewlekłego podawania T3, co dodatkowo potwierdzała podwyższona liczba komórek degenerujących w tej grupie zwierząt.

Publikacja nr 3

Marchlewska K, Kula K, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Słowikowska-Hilczer J. Role of FSH and triiodothyronine in Sertoli cell development expressed by formation of connexin 43-based gap junctions. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 2011, 315(6): 329-336

W kolejnej z prac prezentowanych jako osiągnięcie naukowe podjęto badania mające na celu badanie wpływu T3 i FSH na dojrzewanie komórek Sertolego. Również tu jako jedną z metod pozwalających określić stopień dojrzewania komórek Sertolego wykorzystano immunolokalizację Cx43. Schemat tego badania obejmował grupy zwierząt, które otrzymywały stymulację hormonalną w postaci codziennych iniekcji T3 lub FSH lub

obu tych hormonów razem od 1. do 15. doby życia (Tabela 2). Na podstawie poprzednich publikacji wykazano, że taki sposób podawania hormonu tarczycy wywoływał najsilniejsze zmiany, ale ich charakter nie był do końca wyjaśniony.

Tabela 2. Schemat podawania badanych hormonów. Codzienne iniekcje w objętości 0,1 ml: trijodotyronina - 100 µg/kg ciężaru ciała w 0,025M NaOH w roztworze soli fizjologicznej 0,15M NaCl; placebo - 0,025M NaOH w soli fizjologicznej 0,15M NaCl; FSH 7,5 IU/zwierzę.

Substancja	Iniekcje	Autopsja
Placebo	1. – 15. doba życia	16. doba życia
FSH	1. – 15. doba życia	16. doba życia
Trijodotyronina	1. – 15. doba życia	16. doba życia
FSH+ Trijodotyronina	1. – 15. doba życia	16. doba życia

Wpływ FSH na spermatogenezę jest bezsporny, ale dokładne zbadanie roli tego hormonu na tle działania T3 w procesie rozpoczęcia pierwszej spermatogenezy wydaje się być istotne.

W prezentowanym badaniu brano pod uwagę, poza ekspresją Cx43, szereg parametrów, które podlegają zmianom w trakcie dojrzewania kanalika plemnikotwórczego. Oceniano poziomy hormonów płciowych oraz liczbę i aktywność proliferacyjną komórek Sertolego. W badanych grupach porównano średnicę i długość kanalików plemnikotwórczych i obecność światła kanalika. Oceniano też wpływ podawania badanych hormonów na degenerację komórek. Do identyfikacji komórek Sertolego, jedynych komórek somatycznych wewnątrz kanalika jądra, zastosowano immunohistochemiczne barwienie z zastosowaniem przeciwciała przeciwko wimentynie, komórki płciowe nie wykazywały reakcji (Rycina 2). Obliczono stosunek komórek wimentyno-pozytywnych do wimentyno-negatywnych, który odzwierciedla wydolność komórek podporowych w stymulowaniu procesu spermatogenezy.

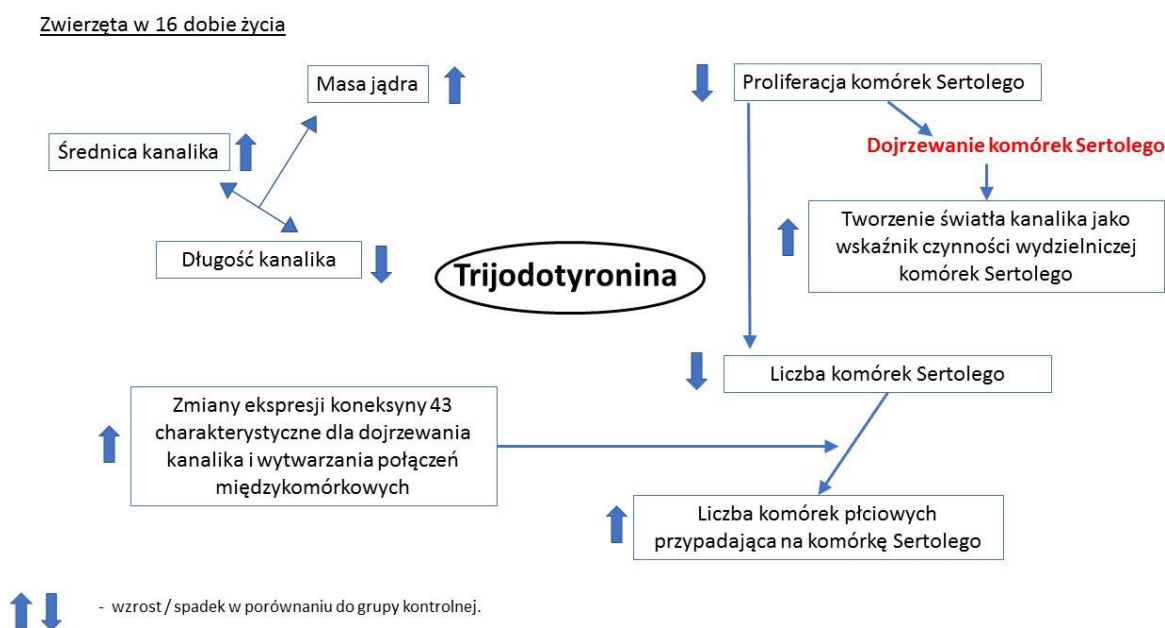
We wszystkich badanych grupach obserwowano znamienne wyższą masę jąder w porównaniu do grupy kontrolnej. Oceniono średnicę i długość kanalików plemnikotwórczych jako parametrów odpowiedzialnych za wielkość gonad. Zarówno w grupie otrzymującej samą T3, jak i w połączeniu z FSH, średnica kanalików była podwyższona, ale długość kanalików nie wykazywała znamiennej różnicy w odniesieniu do grupy kontrolnej. Inaczej prezentowały się wyniki u zwierząt otrzymujących FSH. Średnica

kanalika pozostawała bez zmian, ale długość kanalika była zwiększona, co wskazywało na różny mechanizm działania badanych hormonów. Jednak przedmiotem szczególnego zainteresowania w tym badaniu był wpływ badanych hormonów na komórki Sertolego. Zaobserwowano pozytywny wpływ podawania FSH na liczbę komórek Sertolego oraz znamienne obniżoną ich liczbę w grupie zwierząt otrzymujących T3. Nie wykazano natomiast zmian w porównaniu z grupą kontrolną w grupie otrzymującej oba te hormony. Końcowa ilość komórek Sertolego zależy od ich zdolności do proliferacji oraz natężenia procesów degeneracyjnych. Jedynie w grupie otrzymującej oba hormony jednocześnie obserwowany był wzrost degeneracji.

Założono, że skoro wraz z dojrzewaniem komórek Sertolego ustaje ich czynność proliferacyjna, a rozpoczyna się czynność wydzielnicza obserwowana jako tworzenie się światła kanalików, to oba te parametry będą wskazywały na stopień dojrzałości komórek Sertolego. Odsetek komórek proliferujących oceniałam metodą immunohistochemiczną z przeciwciałem przeciwko PCNA, a następnie obliczałam odsetek kanalików plemnikotwórczych zawierających światło oraz dokonywałam pomiarów jego średnicy. Zwierzęta, które otrzymywały FSH prezentowały wprawdzie obniżony odsetek komórek Sertolego wykazujących proliferację, a także większy odsetek kanalików zawierających światło ale wartości te nie były znamienne statystycznie. Znacznie większy, znamieny spadek odsetka komórek Sertolego ulegających proliferacji i wzrost odsetka kanalików zawierających światło uzyskano w grupie otrzymującej T3, a największe zmiany obserwowano w grupie zwierząt otrzymujących oba hormony. Dojrzałość komórek Sertolego wiąże się z ich wydolnością do podtrzymywania określonej liczby komórek płciowych. W pracy zaobserwowano znacznie większą liczbę komórek płciowych przypadających na jedną komórkę Sertolego w grupie otrzymującej samą T3 oraz znaczne obniżenie tego wskaźnika w grupie otrzymującej oba hormony. Nie było natomiast różnicy w porównaniu z grupą kontrolną w grupie otrzymującej samo FSH. Najciekawsze jednak wyniki uzyskano oceniając ekspresję Cx43 w kanalikach plemnikotwórczych. W jądrach zwierząt otrzymujących samo FSH nie zaobserwowano różnic w lokalizacji Cx43 w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie otrzymującej T3 lokalizacja Cx43 była charakterystyczna dla zwierząt starszych, brak ekspresji w części apikalnej i lateralnej komórek Sertolego oraz widoczna ekspresja w części przypodstawnej, świadczy o przyspieszeniu procesu dojrzewania kanalika i wskazuje na tworzenie bariery krew-jądro oraz połączeń międzykomórkowych. W grupie badanej otrzymującej oba hormony ekspresja badanego białka była słabsza i rozproszona. Schemat lokalizacji nie był typowy

dla zwierząt w tym wieku, ani starszych. Może to wskazywać na zmiany, które opóźniają lub uniemożliwiają wytworzenie połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami Sertolego oraz komórkami Sertolego a komórkami płciowymi.

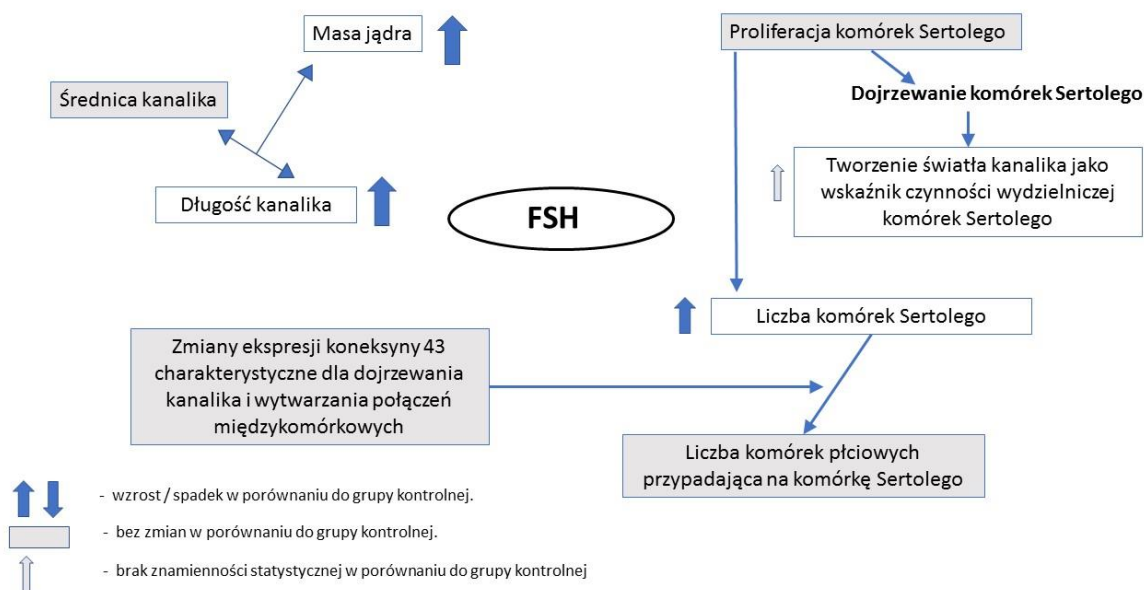
Na podstawie tego badania wyciągnęłam wnioski, które wskazują, że szczególnie T3 wydaje się być odpowiedzialna za powstawanie połączeń międzykomórkowych opartych na Cx43 (Rycina 3). Wydolność komórek Sertolego do utrzymywania tempa spermatogenezy jest prawdopodobnie związana przede wszystkim możliwością komunikacji między komórkami i wytworzeniem bariery krew-jądro.



Rycina 3. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania trijodotyroniny. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), oraz zależności pomiędzy badanymi parametrami.

Jeśli przyjrzymy się efektom działania FSH u badanych zwierząt, to wyraźnie widać wzrost liczby komórek Sertolego, natomiast ich dojrzewanie czynnościowe, wyrażone jest poprzez wytworzenie światła ale tylko w nielicznych kanalikach co może być niezależne od obecności komunikacji między komórkami poprzez połączenia szczelinowe oparte na Cx43 (Rycina 4).

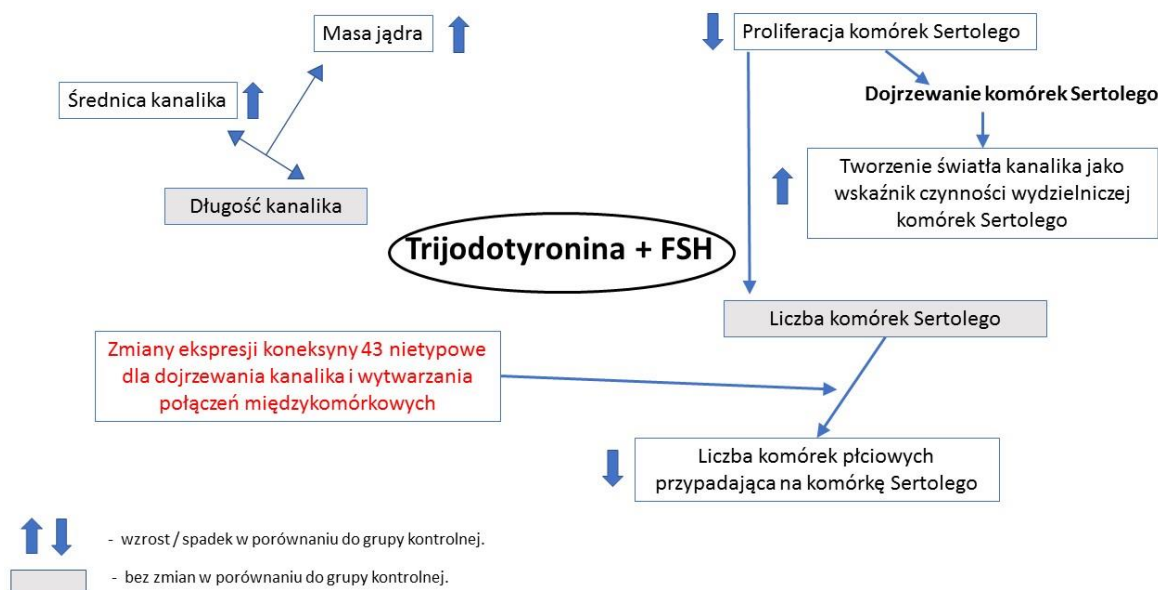
Zwierzęta w 16 dobie życia



Rycina 4. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania FSH. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), zaciemniono parametry, które nie uległy zmianom w porównaniu do grupy kontrolnej, oraz zależności pomiędzy badanymi parametrami zaznaczono strzałkami bez pogrubienia. W obrazie gonady obserwowano powstawanie światła kanalika, ale zmiany te nie wykazywały znamienności statystycznej.

Podawanie T3 i FSH osobno ma wpływ zarówno na rozpoczęcie, jak i tempo spermatogenezy, jednak ich wspólny efekt powoduje zmiany sugerujące uszkodzenie nabłonka plemnikotwórczego, a zwłaszcza zaburzenie komunikacji międzykomórkowej (Rycina 5).

Zwierzęta w 16 dobie życia



Rycina 5. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania trijodotyroniny i FSH. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), zaciemniono parametry, które nie uległy zmianom w porównaniu do grupy kontrolnej, a zależności pomiędzy badanymi parametrami zaznaczono strzałkami bez pogrubienia.

Publikacja nr 4

Marchlewska K, Słowikowska-Hilczer J, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Kula K. *The long-term effects of FSH and triiodothyronine administration during the pubertal period on connexin 43 expression and spermatogenesis efficiency in adult rats. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 2015, 323(4): 256-265

Kontynuując swoje badania nad regulacją hormonalną zapoczątkowania spermatogenezy postanowiłam ocenić wpływ podawania w okresie rozwojowym T3 i FSH na gonadę dorosłego szczura. Poprzednia praca wskazywała na progresywne zmiany w pierwszej spermatogenezie zachodzące pod wpływem podawanych osobno hormonów, a także zmiany o charakterze regresywnym po podaniu badanych hormonów jednocześnie. Efekt podawania hormonów obserwowaliśmy jedynie w 16. dobie bezpośrednio po zakończeniu eksperymentu. W publikacji nr 4 szukałam odpowiedzi na pytanie, czy efekt, który badane hormony wywołują w trakcie pierwszej spermatogenezy jest obserwowany u dorosłego szczura. Schemat doświadczenia był podobny jak w publikacji nr 3 z tą różnicą,

że po zakończeniu podawania hormonów w 15. dobie zwierzęta hodowano do 50. doby życia, kiedy to fizjologicznie obecne są już dojrzałe gamety (Tabela 3).

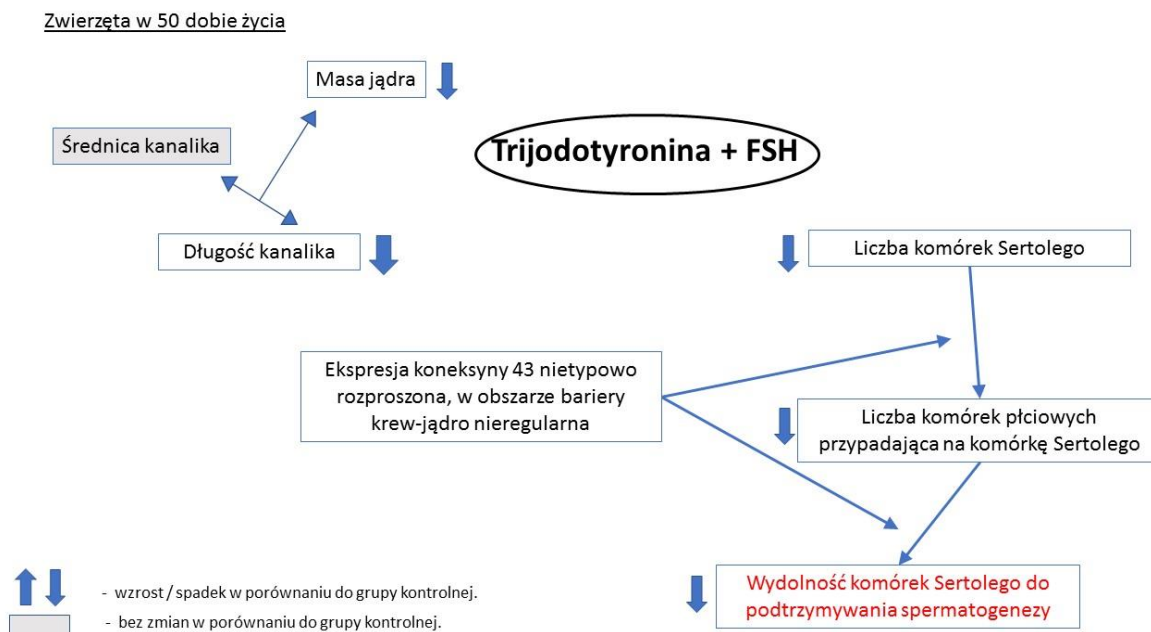
Tabela 3. Schemat podawania badanych hormonów. Codzienne iniekcje w objętości 0,1 ml: trijodotyronina - 100 µg/kg ciężaru ciała w 0,025M NaOH w roztworze soli fizjologicznej 0,15M NaCl; placebo - 0,025M NaOH w soli fizjologicznej 0,15M NaCl; FSH 7,5 IU/zwierzę.

Substancja	Iniekcje	Autopsja
Placebo	1. – 15. doba życia	50. doba życia
FSH	1. – 15. doba życia	50. doba życia
Trijodotyronina	1. – 15. doba życia	50. doba życia
FSH+ Trijodotyronina	1. – 15. doba życia	50. doba życia

Wyniki uzyskane w tym eksperymencie wskazują na istotny wpływ stymulacji badanymi hormonami w okresie inicjacji spermatogenezy na wielkość gonad i parametry morfometryczne kanalików krętych u zwierząt dorosłych. FSH podawana osobno powodowała zwiększenie masy jąder oraz długości kanalików, ale bez wpływu na jego średnicę, natomiast w połączeniu z T3 obserwowano zmniejszoną masę gonad, podobnie jak w grupie otrzymującej samą T3. Jednak mimo różnic w masie gonad średnica kanalików nie różniła się we wszystkich grupach eksperymentalnych w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazuje, że różnice masy gonad zależały od długości kanalików plemnikotwórczych.

Najbardziej spektakularne różnice zaobserwowano w dojrzałych gonadach poddawanych w okresie zapoczątkowania spermatogenezy stymulacji zarówno T3, jaki i FSH (Rycina 6). Obserwowano tu nieprawidłową w porównaniu do grupy kontrolnej ekspresję Cx43. Może to wskazywać na zaburzenie dojrzewania komórek Sertolego, a co za tym idzie na nieprawidłową komunikację międzykomórkową, przez co ekspresja koneksyny w obszarze bariery krew-jądro była słabsza i nieregularna. W grupie tej obserwowano obniżenie liczby komórek Sertolego, oraz obniżenie ich wydolności do podtrzymywania procesu spermatogenezy, wyrażoną jako stosunek liczby komórek Sertolego do komórek płciowych. Wydaje się prawdopodobne, że przyczyną tego zjawiska był brak dostatecznej ilości połączeń międzykomórkowych. Wyniki badań hormonalnych wskazują także na zaburzenie czynności endokrynej gonady. Obserwowany wzrost FSH przy jednoczesnym obniżeniu poziomu testosteronu może wskazywać na hipogonadyzm pierwotny

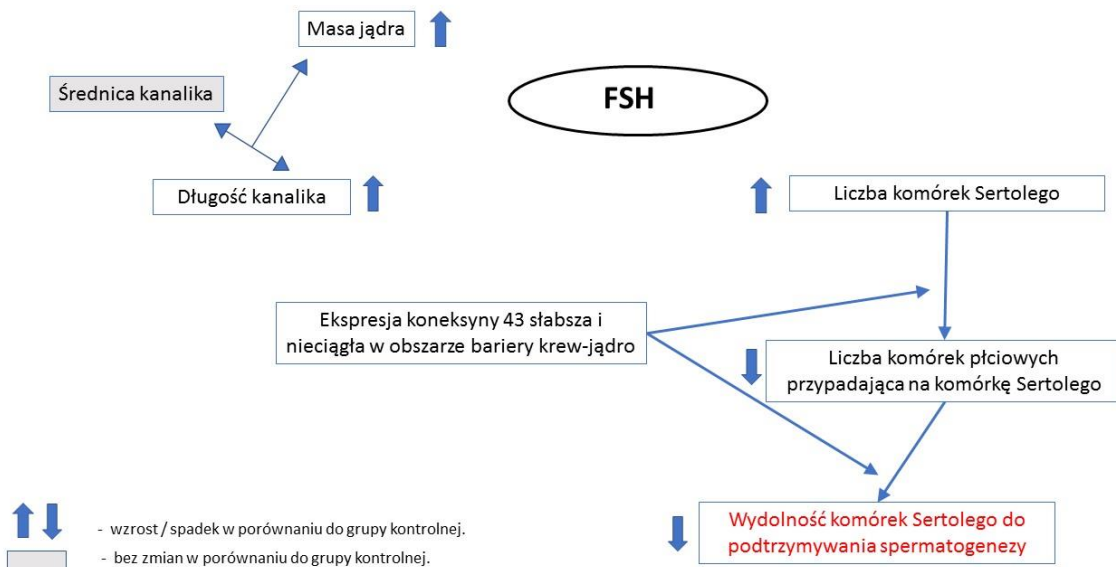
(hipergonadotropowy). Niestety w badaniu nie zaplanowano pomiaru stężenia w surowicy krwi hormonu luteinizującego.



Rycina 6. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania trijodotyroniny i FSH. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), zacieniowano parametry, które nie uległy zmianom w porównaniu do grupy kontrolnej, a zależności pomiędzy badanymi parametrami zaznaczono strzałkami bez pogrubienia.

Grupa zwierząt poddawana działaniu FSH wykazywała zwiększoną ostateczną liczbę komórek Sertolego, jednak immunoekspresja Cx43 jest bardziej dyskretna w porównaniu do grupy kontrolnej. Być może wskazuje to na mniejszą liczbę połączeń międzykomórkowych i w konsekwencji zmniejszenie wydolności komórek Sertolego do podtrzymywania określonej liczby komórek płciowych. FSH wykazuje więc działanie tropowe w stosunku do komórek Sertolego, a mechanizm tego działania powoduje wzrost ich proliferacji. Zwiększona liczba komórek podporowych nie przekłada się jednak na wzrost liczby komórek płciowych, co może wynikać ze słabszej komunikacji międzykomórkowej (Rycina 7). Nie obserwowano wpływu stymulacji FSH w okresie inicjacji spermatogenezy na czynność endokrynną dojrzałej gonady.

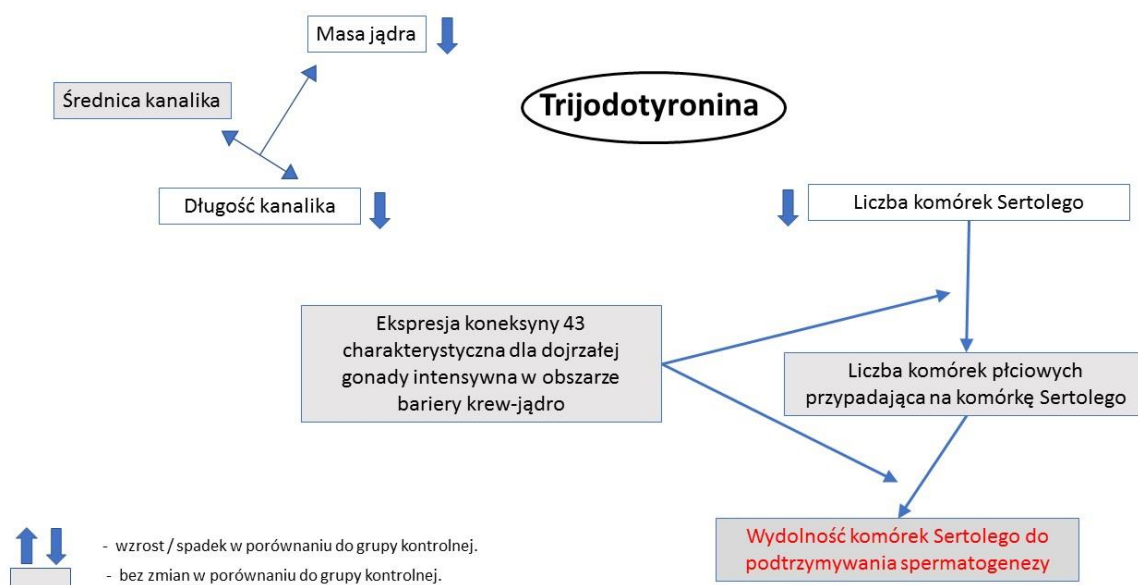
Zwierzęta w 50 dobie życia



Rycina 7. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania FSH. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), zacieniowano parametry, które nie uległy zmianom w porównaniu do grupy kontrolnej, a zależności pomiędzy badanymi parametrami zaznaczono strzałkami bez pogrubienia.

Na skutek stymulacji za pomocą T3 obserwowano przyspieszenie dojrzewania komórek Sertolego i w konsekwencji wcześniejsze wygaszenie ich proliferacji, co wpłynęło negatywnie na ich końcową liczbę, ale nie ograniczyło powstawania połączeń międzykomórkowych. W efekcie wydolność komórek Sertolego do podtrzymywania procesu spermatogenezy wyrażona ich liczbowym stosunkiem do komórek płciowych była porównywalna z grupą kontrolną (Rycina 8) Czynność endokrynną gonad w tej grupie również wydaje się być prawidłowa.

Zwierzęta w 50 dobie życia



Rycina 8. Schemat zmian zachodzących w gonadzie szczura pod wpływem podawania trijodotyroniny. Zaznaczono znamienne statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej (strzałki pogrubione: góra - wzrost, dół - spadek), zaciemniono parametry, które nie uległy zmianom w porównaniu do grupy kontrolnej, oraz zależności pomiędzy badanymi parametrami zaznaczono strzałkami bez pogrubienia.

Podsumowując wyniki uzyskane na podstawie wszystkich zaprezentowanych prac, należy podkreślić rolę T3 w procesie dojrzewania komórek Sertoliego. Wydaje się, że większe znaczenie dla prawidłowego przebiegu procesu spermatogenezy ma czynność a nie ilość komórek podporowych, która może w pewnym stopniu kompensować obniżenie ich liczby. Okres korespondujący z przedmejotycznym etapem spermatogenezy odpowiedzialny jest za wytworzenie w cytoplazmie komórek Sertoliego białka Cx43 przetransportowanie oraz przekształcenie jego konformacji tak by możliwa była jego heksameryzacja i ostatecznie wykształcenie połączeń szczelinowych. Tempo tych zmian zwiększa się pod wpływem podawania T3, czego nie obserwujemy po podaniu FSH. Próba podawania obu hormonów jednocześnie nie wpływa pozytywnie ani na ilość ani na czynność komórek Sertoliego. Zmiany obserwowane w takiej sytuacji mają charakter degeneracyjny i są trwałe. Brak prawidłowej ekspresji Cx43 wpływa negatywnie, bezpośrednio na wydolność komórek Sertoliego do podtrzymywania określonej liczby komórek płciowych oraz pośrednio poprzez obniżenie stężenia testosteronu i podwyższenie FSH w surowicy krwi. Wskazuje to na zaburzenie czynności endokrynnej komórek Leydiga, hipogonadyzm hipergonadotropowy ale wymaga potwierdzenia w osobnych badaniach.

Publikacja nr 5

Marchlewska K, Słowikowska-Hilczer J, Walczak-Jędrzejowska R, Oszukowska E, Filipiak E, Kula K. *Hormony gruczołu tarczowego a czynność jądra. w: Układ płciowy męski, Badania kliniczne i doświadczalne. Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, 2013, 310-315*

Uzupełnieniem cyklu moich prac jest rozdział w książce, w którym podsumowałam aktualny stan wiedzy na temat regulacji hormonalnej procesu spermatogenezy. Na podstawie danych literaturowych oraz wyników badań własnych przedstawiłam nowe poglądy na temat roli T3 i FSH oraz ich wzajemnych interakcji w procesie dojrzewania komórek Sertolego. Chciałabym też podkreślić znaczenie badań nad ekspresją Cx43 w jądrze, która okazała się być bardzo ciekawym narzędziem pozwalającym oceniać mechanizm zmian wywołanych stymulacją hormonalną.

Bibliografia:

1. Ito A, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S: Developmental expression of flt3 mRNA in the mouse brain. *J Mol Neurosci* 1993, 4(4):235-243.
2. Heckert LL, Griswold MD: Expression of follicle-stimulating hormone receptor mRNA in rat testes and Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 1991, 5(5):670-677.
3. Chappel SC, Ramaley JA: Changes in the isoelectric focusing profile of pituitary follicle-stimulating hormone in the developing male rat. *Biol Reprod* 1985, 32(3):567-573.
4. Dohler KD, Wuttke W: Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 1974, 94(4):1003-1008.
5. Negro-Vilar A, Krulich L, McCann SM: Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat. *Endocrinology* 1973, 93(3):660-664.
6. Jannini EA, Dolci S, Ulisse S, Nikodem VM: Developmental regulation of the thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA expression in the rat testis. *Mol Endocrinol* 1994, 8(1):89-96.
7. Jannini EA, Carosa E, Rucci N, Screponi E, D'Armiento M: Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. *J Endocrinol Invest* 1999, 22(11):843-848.
8. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG: Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000, 62(3):664-669.
9. Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, Jannini EA, Martino E, Pinchera A, Macchia E: Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl* 2001, 22(2):284-288.
10. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM: Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996, 272(5263):877-880.
11. Lu L, Schulz H, Wolf DA: The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 2002, 3:22.
12. Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR: Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 2003, 144(9):3722-3731.

13. Holsberger DR, Jirawatnotai S, Kiyokawa H, Cooke PS: Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology* 2003, 144(9):3732-3738.
14. Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kiesewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, Franca LR, Kiyokawa H, Cooke PS: Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod* 2005, 72(6):1429-1436.
15. Cheng CY, Mruk DD: Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002, 82(4):825-874.
16. Yan HH, Mruk DD, Cheng CY: Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. *Curr Top Dev Biol* 2008, 80:57-92.
17. Loewenstein WR, Rose B: The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol* 1992, 3(1):59-79.
18. Kopera-Sobota IB, B.: Rola połączeń międzykomórkowych i regulacja ich funkcjonowania w gonadzie męskiej ssaków. *Postępy Biologii Komórki* 2011, 38(4):685-711.
19. Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D, Pointis G: A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 2006, 209(1):153-161.
20. Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS: Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod* 2007, 76(5):804-812.
21. Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lecureuil C, Steger K *et al*: A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 2007, 171(1):19-31.
22. Barker SB, Klitgaard HM: Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. *Am J Physiol* 1952, 170(1):81-86.
23. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI: Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology* 1974, 95(3):897-903.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Ukończyłam studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w roku 1997 (kierunek biologia, specjalizacja biochemia). W latach 1997-2000 pracowałam na etacie Szpitala Klinicznego nr 3 w Łodzi (obecnie Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. WAM - Centralny Szpital Weteranów) jako młodszy asystent kliniczny w Samodzielnej Pracowni Andrologii i Endokrynologii Płodności Instytutu Endokrynologii, Akademii Medycznej w Łodzi. W tym okresie moja praca skupiała się głównie na badaniach laboratoryjnych. Rozwinęłam diagnostykę zmian nowotworowych w jądrze opartą na metodach immunohistochemicznych. Rozwinęłam też w oparciu o tę metodykę badania nad proliferacją, różnicowaniem, apoptozą i immunolokalizacją białek komórkowych w gonadzie męskiej. W efekcie uzyskiwanych przeze mnie wyników powstawały publikacje naukowe jednostki. Zajmowałam się również badaniami związanymi z diagnostyką

plodności męskiej. Wprowadziłam do laboratorium badania biochemiczne plazmy nasienia oraz badania mające na celu wykrywanie przeciwciał przeciwplemnikowych. Przygotowałam do celów dydaktycznych zestaw procedur i zasad postępowania w diagnostyce seminologicznej dla studentów Akademii Medycznej (obecnie Uniwersytetu Medycznego) w Łodzi i na potrzeby kursów doskonalących w tej dziedzinie. W tym okresie zajmowałam się i zajmuję do chwili obecnej, podnoszeniem standardów dotyczących badania nasienia zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia roku 1999, oraz obecnie obowiązujących z roku 2010. Uczestniczyłam też w badaniach doświadczalnych na zwierzętach, co umożliwiło mi zapoznanie się ze stereologicznymi metodami ilościowej analizy nabłonka plemnikotwórczego i gruczołu śródmiąższowego jądra. W oparciu o literaturę naukową opracowałam metodykę pozwalającą na wywołanie hipotyreozy u szczura. Efektem tych badań jest praca oryginalna opublikowana w monografii (*Załącznik 4, poz. II D, 6*), oraz szereg doniesień zjazdowych zaprezentowanych w latach 1999-2002 (*Załącznik 4, poz. III B, 3, 4, 9*). Osiągnięte w ten sposób umiejętności wykorzystałam przy planowaniu i realizacji badań będących podstawą mojej dalszej pracy naukowej.

W roku 2000 rozpoczęłam czteroletnie studia doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym. Badania, które w tym okresie prowadziłam dotyczyły hormonalnej kontroli spermatogenezy. Badania doświadczalne, pod kierunkiem prof. dr. hab. n. med. Krzysztofa Kuli, których wynikiem była moja rozprawa doktorska obroniona z wyróżnieniem w roku 2004, skoncentrowane były na wpływie podawania T3 na gonadę szczura. Uwzględniały badania nad fizjologią układu endokrynnego tych zwierząt w okresie przed pierwszą spermatogenezą. Badałam również wpływ T3 na liczebność komórek płciowych w poszczególnych stadiach pierwszej spermatogenezy. Wykazałam, że fizjologicznie, począwszy od 10. doby życia szczura średnie stężenia T3 i FSH we krwi zachowywały się przeciwstawnie. Stopniowemu wzrostowi poziomu T3 towarzyszyło stopniowe obniżenie poziomu FSH. W tym okresie rozwojowym, zapoczątkowanie i naturalny wzrost wydzielania T3 są równoległe do dynamiki wzrostu masy ciała i masy jąder, co wskazywać może na pobudzającą rolę hormonu tarczycy w rozwoju osobniczym szczura. W jądrach nie poddawanych zmianom eksperymentalnym, różnicowanie płodowych komórek płciowych (gonocytów) do pierwszych spermatogonii występuje wkrótce po rozpoczęciu wydzielania T3 i FSH, co wskazuje, że oba hormony mogą być związane z wywołaniem pierwszej spermatogenezy. Różnicowanie spermatogonii do pierwszych komórek mejotycznych występuje wkrótce po wzroście wydzielania T3, a obniżeniu wydzielania FSH, co może wskazywać na dominującą rolę T3 w zapoczątkowaniu spermatogenezy. Badania

doświadczalne wykazały, że T3 w pierwszych dniach życia pobudza różnicowanie gonocytów do pierwszych spermatogonii i nasila proliferację spermatogonii bez zmian w wydzielaniu FSH.

W latach 2001-2002 wstępne wyniki mojej pracy doktorskiej zaprezentowane zostały w formie doniesienia naukowego na 5. Europejskim Kongresie Endokrynologicznym (Włochy) (*Załącznik 4, poz. III B, 2*) oraz opublikowane w formie streszczenia w Endokrynologii Polskiej (*załącznik 4, poz. III B, 7*). Końcowe wyniki mojej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w roku 2004 i 2005 w formie streszczeń w języku polskim i angielskim (*Załącznik 4, poz. III B, 12, 15, 17, 23*).

Były to badania, które zainspirowały mnie do wyboru kierunku mojej późniejszej pracy naukowej.

Od roku 2004-2009 zatrudniona byłam w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi Zakładzie Andrologii pod kierownictwem prof. dr hab. med. Krzysztofa Kuli. W ramach swojej działalności naukowej uczestniczyłam w 8 projektach badawczych. Wynikiem tej działalności są prace oryginalne dotyczące m.in. hormonalnej kontroli spermatogenezy u zwierząt (*Załącznik 4, poz. II. A, 14, 15, 16 oraz D 6*), patogenezy zmian nowotworowych w jądrze (*Załącznik 4, poz. II. A, 17*), czynników wpływających na czynność gonady męskiej, (*Załącznik 4, poz. II. D, 4, 5*) oraz prace poglądowe dotyczące hormonalnej kontroli gonady męskiej (*Załącznik 4. Poz. II. D, 14, 15, 16*).

W ramach badań doświadczalnych nad hormonalną kontrolą spermatogenezy jestem współautorem prac oceniających wpływ estradiolu na gonadę szczura (*Załącznik 4, poz. II. A, 14, 15, 16*). Najważniejszym osiągnięciem w prezentowanych publikacjach było wykazanie, że łączne działanie estradiolu i FSH powodowało wzrost przeżywalności komórek plemnikotwórczych. Natomiast podawanie samego estradiolu powodowało wzmożoną apoptozę oraz zahamowanie dojrzewania komórek Sertolego.

Jednym z badanych aspektów hormonalnej kontroli czynności jądra były badania dotyczące wpływu ksenoestrogenów (dietylstilbestrolu i zearalenonu) podawanych w okresie dojrzewania (*Załącznik 4, poz. II. A, 13; Poz. III. B, 25, 27*). Pod wpływem wszystkich analizowanych substancji w zależności od zastosowanej dawki dochodziło przede wszystkim do zahamowania wzrostu jądra (zmniejszenie masy jądra, średnicy i całkowitej długości kanalików plemnikotwórczych) oraz zmniejszenia liczebności komórek Sertoliego. W okresie dojrzewania jądra szczura komórki Sertoliego stanowią główny cel negatywnego działania estradiolu, jak i badanych ksenoestrogenów.

Od roku 2009 do chwili obecnej pracuję w Zakładzie Endokrynologii Płodności pod kierownictwem prof. dr hab. med. Jolanty Słowikowskiej-Hilczer. W tym okresie badania, w których uczestniczyłam, dotyczyły oprócz hormonalnej regulacji zapoczątkowania spermatogenezy i diagnostyki andrologicznej, także stanu przedrakowego w jądrze ludzkim (CIS, *lac. Carcinoma in situ*) oraz endokrynologicznych, molekularnych i psychologicznych aspektów zaburzeń różnicowania płciowego.

Efektom badań dotyczących diagnostyki andrologicznej było powstanie prac oryginalnych, których jestem pierwszym autorem (*Załącznik 4, poz. II. A, 1; Poz. II. D 1, 3*) lub mój udział był równy z pierwszym autorem (*Załącznik 4, poz. II. A, 6*) oraz pracy gdzie byłam współautorem (*Załącznik 4, poz. II. A, 2*). Jestem też współautorem prac poglądowych dotyczących zagadnień związanych z diagnostyką płodności męskiej (*Załącznik 4, poz. II. D, 7, 8, 13; E, 2*). W badaniach tych skupiałam się na doskonaleniu metodologii i kontroli jakości analizy podstawowego badania nasienia oraz rozszerzeniu diagnostyki niepłodności męskiej o badania dodatkowe, które przyczyniają się do zmniejszenia liczby przypadków tzw. niepłodności idiopatycznej. W pracach tych podkreślałam znaczenie określenia przyczyn niepłodności męskiej. Zaprezentowałam tu wyniki dotyczące metod oceny czynności plemników wyrażonej poprzez ich zdolność do wiązania z kwasem hialuronowym, badań nad fragmentacją i protaminacją chromatyny plemnikowej. Staralam się również popularyzować w środowisku medycznym potrzebę szerszej diagnostyki mężczyzn z niepłodnych par na konferencjach krajowych i zagranicznych. Wygłosiłam na ten temat 10 wykładów (*Załącznik 4, poz. II K. 3, 6-14*), obecnie uczestniczę również w cyklu co miesięcznych szkoleń organizowanych przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych dotyczących podnoszenia kwalifikacji w manualnej ocenie seminologicznej. Jestem autorem wielu doniesień zjazdowych dotyczących tego zagadnienia. W ramach powołanej przez Polskie Towarzystwo Andrologiczne Komisji do Spraw Konsensusu Lekarsko-Diagnostycznego, której jestem członkiem, w 2010 roku po raz pierwszy w kraju zostały opracowane standardy wykonywania badania nasienia metodą manualną wg aktualnych rekomendacji Światowej Organizacji Zdrowia (*Załącznik 4, poz. II D. 13*). Natomiast w 2015 roku na zaproszenie Pani Prezes Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dr n. med. Elżbiety Puacz zostały opracowane, opublikowane i rozesłane do wszystkich laboratoriów w Polsce rekomendacje Polskiego Towarzystwa Andrologicznego i Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dotyczące badania nasienia metodą manualną (*Załącznik 4, poz. II D. 8*).

W roku 2009/2010 opracowałam ankietę mającą na celu ocenę standardów metodologicznych w laboratoriach seminologicznych. Dzięki temu udało się ocenić jakość wykonywanych analiz nasienia w regionie łódzkim. Efektem tych badań była praca licencjacka studenta Wydziału Pielęgniarstwa i Położnictwa, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Ankietę tą wykorzystano następnie do badania przeprowadzonego wśród 55 pracowników laboratoriów seminologicznych w Polsce. Wyniki tych badań zostały opublikowane w roku 2013 w postaci pracy oryginalnej, w której mój udział z pierwszym autorem był równy (*Załącznik 4, poz. II A, 6*), jest to pierwsza analiza w kraju poruszająca ten istotny problem. Obecnie opracowuję materiał do następnych publikacji dotyczących diagnostyki andrologicznej m.in. na temat roli stresu oksydacyjnego w niepłodności męskiej oraz możliwości oceny jego występowania w plazmie nasienia i uszkodzeń oksydacyjnych w plemnikach oraz wpływu gruczołów dodatkowych męskiego układu płciowego oraz czynników środowiskowych na płodność mężczyźni w wieku reprodukcyjnym. Wstępnie wyniki zostały zaprezentowane przez studentkę z Koła Naukowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pozostającą pod moją opieką, na 54 Międzynarodowej Konferencji *Juvenes Pro Medicina*. Na podstawie tych badań powstało też 6 prac magisterskich, których byłam promotorem, a jedna jest obecnie realizowana.

Tematyka związana z zaburzeniami dotyczącymi młodych mężczyzn w okresie reprodukcyjnym była poruszana w pracach oryginalnych (*Załącznik 4, poz. II A. 4, 12; D. 4. 5*), a dotyczyła oceny wpływu stanu hormonalnego oraz stylu życia na stan zdrowia fizycznego, psychicznego i seksualnego młodych mężczyzn. Na uwagę zasługuje tu szczególnie praca w której mój udział z pierwszym autorem jest równy (*Załącznik 4, poz. II A.5*), gdzie wykazano, że bioaktywne frakcje estradiolu i testosteronu mają pozytywny wpływ na dojrzewanie kośćca u mężczyzn do wieku około dwudziestu lat, następnie ich poziom i znaczenie w tym procesie stopniowo się obniża, wydaje się interesująca.

Jestem również współautorem prac będących efektem realizacji projektów naukowych dotyczących dysgenezy gonad (*Załącznik 4, poz. II A.11; D. 2, 9, 10*) i nowotworów gonad (*Załącznik 4, poz. II A.3*). W efekcie tych prac udało się wykazać, że dysgenezy gonad towarzyszy zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów jąder ale wzrasta ono w kiedy zmiany dysgenetyczne są mniej zaawansowane. Stwierdzono również wysokie ryzyko nowotworu gonad wywodzącego się z komórek zarodkowych TGTC u pacjentów z chromosomem Y (około 50%). Jeśli zostaną one zachowane do okresu dojrzewania lub wczesnej dorosłości, mogą rozwinąć jawną postać guza. Gonady takie charakteryzuje również słaba aktywność hormonalną. Badania te pozwoliły na ustalenie

zasad postępowania medycznego w przypadku pacjentów z dysgenesją gonad. Każdy z tych przypadków należy rozpatrywać indywidualnie, a decyzja o usunięciu lub pozostawieniu gonad powinna być oparta na wszechstronnej analizie fenotypu przez wielodyscyplinarny zespół specjalistów w porozumieniu z pacjentem i rodzicami. Jeśli gonady nie są usuwane w dzieciństwie, ci pacjenci wymagają starannych badań kontrolnych, w tym biopsji i oceny histopatologicznej.

Udział w projektach naukowych

Badania doświadczalne

W ramach badań doświadczalnych nad hormonalną kontrolą spermatogenezy, oprócz tych których efektem była moja praca doktorska oraz cykl prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, uczestniczyłam w pracach własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, jako wykonawca (3 projektów) i kierownik (1 projekt). Badania te dotyczyły wpływu podawania hormonów tarczycy oraz FSH, a także testosteronu, estradiolu i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG, *ang. human Chorionic Gonadotropin*) oraz ksenoestrogenów (diethylstilbestrol, dibutyl ftalanu i zearalenon) na: 1) rozwój jądra w okresie płodowym oraz różnicowanie płodowych komórek płciowych, gonocytów, do spermatogonii, 2) zapoczątkowanie procesu spermatogenezy i różnicowanie pierwszych spermatogonii do komórek plemnikotwórczych wyższych etapów, 3) namnażanie i dojrzewanie komórek Sertolego 4) rozwój jądra u dorosłego osobnika poddanego stymulacji hormonalnej w okresie dojrzewania oraz 5) immunоекспресję Cx43 jako wyraz formowania międzykomórkowych połączeń szczelinowych w nabłonku plemnikotwórczym u zwierząt doświadczalnych w różnych okresach życia począwszy od płodowego poprzez dojrzewanie aż do okresu dojrzałości.

Wyniki pracy własnej realizowanej w latach 2008-2010, której byłam kierownikiem (*Wpływ trijodotyroniny oraz trijodotyroniny podawanej łącznie z FSH, testosteronem i estradiolem w okresie dojrzewania płciowego na zainicjowanie spermatogenezy oraz spermatogenezę u dojrzałych płciowo szczurów; Załącznik 4, poz. II, I, 13*) pozwoliły na przygotowanie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe. Wykazałam w że T3 działając przez krótki okres przy zapoczątkowaniu spermatogenezy (od urodzenia do 5. doby życia szczura), przyspiesza rozwój pierwszych spermatogonii, przy równoczesnym wzmożeniu różnicowania, proliferacji oraz degeneracji komórek plemnikotwórczych. Doprowadza to w 16. dobie życia do przedwczesnego zakończenia pierwszych etapów spermatogenezy.

Dodatkowo, hormon ten wykazuje dwufazowy wpływ na namnażanie komórek Sertolego. Efekt pobudzający jest ograniczony do kilku pierwszych dni po urodzeniu szczura, podczas gdy efekt hamujący pojawia się podczas dalszego rozwoju jądra. Badano też wpływ T3 na ekspresję Cx43, białka międzykomórkowych połączeń szczelinowych, w okresie dojrzewania jądra i zapoczątkowania spermatogenezy. Wyniki wykazały, że podawanie T3 niedojrzałym szczurom powodowało przyspieszone formowanie i dojrzewanie połączeń szczelinowych co wiązało się ze zmianą ich lokalizacji między przylegającymi komórkami Sertolego. Z kolei podawanie T3 z FSH wywoływało efekt hamujący doprowadzając do uszkodzenia połączeń, co wiązało się ze wzrostem degeneracji komórek plemnikotwórczych. Efekty badań stymulacji hormonalnej oceniono zarówno bezpośrednio po zakończeniu doświadczeń jak i u dorosłych zwierząt. Oprócz publikacji opisanych jako osiągnięcie naukowe uzyskane wyniki były także prezentowane w formie doniesień naukowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach.

W pracy własnej realizowanej w latach 2003-2005, której kierownikiem była dr hab. n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska (*Alternatywne i synergistyczne działanie gonadotropin, testosteronu, estradiolu i trijodotyroniny na zapoczątkowanie spermatogenezy; Załącznik 4, poz. II I, 9*) uczestniczyłam jako wykonawca. Badania wykazały, że podawanie niedojrzałym szczurom estradiolu i testosteronu łącznie przyspieszało wzrost jądra, oraz dojrzewanie komórek Sertolego, a także zwiększyło liczbę komórek plemnikotwórczych. Z kolei podawanie szczurom hCG hamowało zapoczątkowanie pierwszej spermatogenezy prawdopodobnie w wyniku obniżenia biosyntezy estradiolu i/lub podwyższenia wytwarzania testosteronu i tym samym zachwiania równowagi między poziomami wytwarzanych steroidów płciowych.

W latach 1999-2001 uczestniczyłam jako wykonawca w pracy własnej kierowanej przez prof. Jolantę Słowikowską-Hilczera (*Badania nad rolą hormonów tarczycy w rozwoju kanalika plemnikotwórczego w okresie przeddojrzewaniowym u szczura; Załącznik 4, poz. II I, 8*). W badaniach tych wykazano, że okres między 19. dobą życia płodowego a 8. dobą życia po urodzeniu u szczura jest krytyczny dla rozwoju kanalików jądra i różnicowania płodowych komórek płciowych, gonocytów, do spermatogonii. Brak hormonów tarczycy na tym etapie rozwoju powoduje zahamowanie różnicowania gonocytów i zmiany przypominające dysgenezę gonad u ludzi. Wskazuje to, że hormony tarczycy biorą udział w regulacji pierwszej spermatogenezy, a ich niedobór powoduje patologiczną akumulację gonocytów. Wyniki te zostały przedstawione na I Europejskim Kongresie Andrologicznym,

w L'Aquila we Włoszech w roku 2000 (*Załącznik 4, poz. III B, 1*), gdzie otrzymały Nagrodę Europejskiej Akademii Andrologii (*Załącznik 4, poz. II J, 1*).

W pracy własnej realizowanej w latach 2007-2009, której kierownikiem była dr n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska (*Wpływ steroidów płciowych oraz ksenoestrogenów (dietylstilbestrolu, dibutyl ftalanu i zearalenonu) na zainicjowanie gametogenezy i czynność komórek somatycznych jądra w okresie dojrzewania u szczura; Załącznik 4, poz. II I, 12*) uczestniczyłam jako wykonawca. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze doniesienia dotyczące negatywnego wpływu ksenoestrogenów na spermatogenezę i wzrost jąder szczurów, oraz po raz pierwszy wykazały także negatywny wpływ zearalenonu na badane parametry. Pod wpływem wszystkich analizowanych substancji dochodziło przede wszystkim do zahamowania wzrostu jądra (zmniejszenie masy jądra, średnicy i całkowitej długości kanalików plemnikotwórczych) oraz zmniejszenia liczebności komórek Sertolego. Najsilniejszy negatywny wpływ na liczebność komórek plemnikotwórczych obserwowany był po dietylstilbestrolu. Obniżenie liczby komórek plemnikotwórczych, prawdopodobnie na skutek apoptozy, może być związane ze zmniejszeniem liczby komórek Sertolego, a tym samym z potrzebą liczbowego dopasowania obu typów komórek. Może to sugerować, że w okresie dojrzewania szczura komórki Sertolego stanowią główny cel negatywnego działania estradiolu, jak i badanych ksenoestrogenów. Jednakże w świetle poprzednich naszych wyników, nie można wykluczyć, że związki wykazujące działanie estrogenne mogą także bezpośrednio wpływać na komórki plemnikotwórcze.

Badania kliniczne i diagnostyka andrologiczna u ludzi

W ramach badań klinicznych dotyczących gonad dysgenetycznych, zaburzeń spermatogenezy, badań nad przedinwazyjnym nowotworem jądra wywodzącym się z komórek płciowych, diagnostyki andrologicznej u mężczyzn pochodzących z niepłodnych par i jawnymi guzami jąder uczestniczyłam jako główny wykonawca i wykonawca w 2 projektach naukowych Narodowego Centrum Nauki, jako wykonawca w projekcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz jako wykonawca w 4 pracach własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, dwukrotnie jako wykonawca w Grancie Prezydenta Miasta Łodzi. Ponadto uczestniczyłam w 2 badaniach wielośrodkowych w ramach programów badawczych Komisji Europejskiej

W latach 2013-2016 byłam głównym wykonawcą w projekcie naukowym Narodowego Centrum Nauki (*Ocena integralności chromatyny plemnikowej oraz*

dojrzałości czynnościowej plemników u mężczyzn ze zmianami nowotworowymi w jądrach; Załącznik 4, poz. II I, 6; kierownik projektu prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer). W badaniach skoncentrowaliśmy się na ocenie integralności genomu plemników przy użyciu testu dyspersji chromatyny, oraz ocenie dojrzałości plemników przy użyciu testu wiązania z kwasem hialuronowym (ang. *Hyaluronan Binding Assay* – HBA). Celem projektu było zbadanie zależności pomiędzy zaburzeniami spermatogenezy prowadzącymi do rozwoju raka jądra a stopniem integralności chromatyny plemnikowej oraz dojrzałością plemników wyrażoną poprzez ocenę ich zdolności do wiązania się z kwasem hialuronowym. Dodatkowo badania miały wykazać, czy istnieje zależność pomiędzy czynnością plemników a fragmentacją chromatyny u mężczyzn bez nowotworu jądra.

W efekcie realizowania grantu zgromadzono wyniki 312 mężczyzn w wieku od 25-58 lat. Byli to mężczyźni zgłaszający się do Poradni Andrologicznej z powodu niepłodności małżeńskiej lub guza jądra. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu wskazują, że u mężczyzn z nowotworami jąder przed zabiegiem orchidektomii i leczeniem onkologicznym, fragmentacja chromatyny i/lub zaburzenie czynności wyrażone brakiem wiązania z kwasem hialuronowym występują u 96% przypadków. Na podkreślenie zasługuje fakt, że jako pierwsi badaliśmy stan gamet przed jednostronną orchidektomią, a nie jak w dostępnej literaturze po usunięciu gonady. Przyjmujemy zatem, że w ejakulacie znajdowały się plemniki pochodzące z jądra objętego procesem nowotworowym. Porównując wyniki naszych badań i badań innych ośrodków, możliwe wydaje się stwierdzenie, że jakość plemników uzyskanych przed zabiegiem usunięcia gonady jest znacznie gorsza niż po takim zabiegu ale przed rozpoczęciem terapii onkologicznej. Nasze badanie może przyczynić się do ustalenia najlepszego okresu do zastosowania krioprezerwacji nasienia u mężczyzn z nowotworami jądra. W populacji mężczyzn bez nowotworów jąder zaburzenia dotyczące jakości chromatyny plemnikowej i czynności wyrażonej poprzez wiązanie z kwasem hialuronowym okazały się częste i ujawniały się również u mężczyzn z prawidłowymi wynikami badania ogólnego nasienia. Z naszych obserwacji wynika, że część przyczyn niepłodności nie rozpoznanych w rutynowej diagnostyce (niepłodność idiopatyczna) mogłaby być ustalona, gdyby była możliwa rozszerzona diagnostyka o proponowane tu badania. Wyniki zaprezentowano w formie publikacji (Załącznik 4, poz. II A, 1) i wykładu (Załącznik 4, poz. II K, 13).

Obecnie biorę udział jako wykonawca w projekcie finansowanym przez narodowe Centrum Nauki realizowanym w latach 2015-2018 pod kierownictwem prof. dr hab. med. Krzysztofa Kuli (OPUS7, *Ekspresja genów dla aromatazy i receptorów estrogenowych*

w tkankach jądra u mężczyzn z prawidłową i uszkodzoną spermatogenezą. Załącznik 4, poz. III, 7).

Projekt jest prowadzony przy współpracy z prof.dr hab. Magdaleną Bryś i dr Ewą Formą z Katedry Cytobiologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Prof. Ewą Rajpert-de Meyts, dr Anne Joregensen, from the Department of Growth and Reproduction, Rigshospitalet in Copenhagen (Dania). Celem badań jest ocena zależności pomiędzy ekspresją genu aromatazy, enzymu katalizującego konwersję androgenów do estrogenów, oraz genów dla receptora estrogenowego i jądrach mężczyzn z prawidłową oraz zaburzoną spermatogenezą a czynnością komórek płciowych oraz komórek somatycznych jądra (komórki Sertoliego i Leydiga). Uzyskane wyniki mogą odpowiedzieć na pytanie czy zmiany ekspresji tych genów są istotne dla regulacji prawidłowej i zaburzonej spermatogenezy u człowieka.

W badaniach wykorzystywane są bioptaty jąder pacjentów z prawidłową spermatogenezą oraz idiopatycznym, pierwotnym uszkodzeniem spermatogenezy, zarchiwizowane w Katedrze Andrologii i Endokrynologii Płodności. Zastosowano techniki mikrodysekcji laserowej tkanek, które umożliwiają przygotowanie preparatów do oceny ekspresji genów z wyodrębnieniem poszczególnych obszarów tkanki. Osobno oceniane będą kanaliki plemnikotwórczych i gruczoł śródmiąższowy bogaty w komórki Leydiga. Zastosowanie tego typu preparatów zmniejsza ryzyko popełnienia błędu przy ocenie ekspresji genów ze względu na to, że tkanka jądra jest strukturą dość zróżnicowaną i składa się z kilku typów różnych komórek. Badania zostaną poparte badaniami ekspresji białek metodami immunohistochemicznymi oraz analizą morfometryczną tkanki jądra. Zostanie również przeprowadzona ilościowa analiza komórek jądra oraz analiza dotycząca dojrzałości komórek Sertoliego, Leydiga i czynności komórek plemnikotwórczych (apoptoza, proliferacja) co umożliwi powiązanie zmian w ekspresji w/w genów z czynnością plemnikotwórczą i endokrynną jądra.

W latach 2010-2013 brałam udział jako wykonawca w grantie MNiSW (*Molekularne uwarunkowania zaburzeń różnicowania i rozwoju gonad oraz ich klinicznych konsekwencji*; Załącznik 4, poz. II I, 4; kierownik: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer). Celem realizowanego projektu było poszukiwanie zmian genetycznych odpowiedzialnych za zaburzenia różnicowania płciowego (ZRP), a także ocena rozwoju fizycznego i stanu psychicznego u dorosłych osób z ZRP oraz poznanie historii naturalnej zmian patologicznych w ich gonadach, w szczególności występowania przedinwazyjnych i inwazyjnych zmian nowotworowych oraz cech dysgenezy gonad. Grant był realizowany we współpracy z prof. Ewą Rajpert de Meyts z Department of Growth and Reproduction,

Rigshospitalet w Kopenhadze (Dania). W wyniku realizacji projektu udało się zgromadzić materiał pochodzący od 70 pacjentów u których wykonana została analiza sekwencji kodujących (genotypowanie) 80 różnych genów biorących udział w rozwoju układu płciowego (tzw. panel „DSD” ang. *disorders of sex development*). Celem analizy było określenie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Uzyskane dane zostały przeanalizowane pod kątem wykrywania rzadkich wariantów SNP i uchwycenia ewentualnej asocjacji z zaburzeniem genetycznym. Najwięcej rzadkich wariantów znalezionych zostało w następujących genach *CYP21A2*, *AR*, *HSD3B1*, *FGFR3*, *JMJD1C*, *MAP3K1*, *WWOX*, *CGB8 19*, *DHCR7*, *GPRC6A*, *INSR 19*, *KAL1 X*, *HSD17B3*.

Dodatkowo w ramach realizacji projektu oceniano stan psychiczny osób z ZRP, które braku ustaleń co do postępowania diagnostycznego i terapeutycznego, oraz indywidualnego podejścia do każdego przypadku mają często poczucie braku akceptacji ze strony otoczenia, obniżoną samoocenę i stany depresyjne.

W latach 2002-2009 uczestniczyłam w badaniach wielośrodkowych w ramach programu badawczego Komisji Europejskiej (5. Program Ramowy) (*Badania nad starzeniem się mężczyzn w Europie: częstość występowania i rozkład geograficzny objawów starzenia się mężczyzn oraz ich zależność od czynników endokrynologicznych, genetycznych i psychosocjalnych*. akronim EMAS; Załącznik 4, poz. II I, 4; kierownikiem projektu ze strony polskiej: prof. dr hab. med. Krzysztof Kula). W ramach tego projektu badania prowadzone były we współpracy z następującymi ośrodkami w Europie:

- Department of Endocrinology, Manchester Royal Infirmary, Victoria University of Manchester, Wielka Brytania,
- Scanian Andrology Centre, Department of Urology, Malmö University Hospital, Malmö, Szwecja,
- Andrology Unit, United Laboratories of Tartu University Clinics, Tartu, Estonia,
- Department of Obstetrics, Gynaecology and Andrology, Albert Szent-Gyorgy Medical University, Szeged, Węgry,
- Department of Andrology and Endocrinology, Centre of Metabolic Bone Diseases, Catholic University of Leuven, Belgia,
- Department Medicina, Laboratorio de Endocrinology Molecular, Universidade de Santiago de Compostela, Hiszpania,
- Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Włochy.

W naszym ośrodku zbadano 408 mężczyzn wieku 40-79 lat w I fazie i 330 po upływie 4 lat (faza II). Wyniki uzyskane w ramach tego projektu wykazały m.in. że otyłość i choroby ogólnoustrojowe są najważniejszymi czynnikami warunkującymi zależne od wieku obniżenie poziomu testosteronu we krwi. Dzięki projektowi udało się też opracować minimalne kryteria rozpoznania hipogonadyzmu wieku późnego (LOH, ang. *Late Onset Hypogonadism*) u zdrowych mężczyzn. Są nimi: 1) symptomy kliniczne związane z aktywnością seksualną mężczyzn, oraz 2) niskie stężenie testosteronu całkowitego we krwi (<11 nmol/L) lub testosteronu wolnego (220 pmol/L). Okazało się, że przy zastosowaniu tych kryteriów występowanie LOH w ogólnej populacji starszych mężczyzn w Europie wynosiło 2,1%.

Kolejnym projektem, realizowanym w latach 2012-2016, w którym brałam udział jako wykonawca, był projekt Komisji Europejskiej (7 Program Ramowy, HEALTH.2012.2.4.4, *Observational trials in rare diseases*) (*Clinical European study on the outcome of surgical and hormonal therapy and psychological intervention in disorders of sex development (DSD)*; akronim *DSD-life*; Załącznik 4, poz. II I, 7; kierownik projektu ze strony polskiej: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer). W ramach realizacji programu współpracuję z następującymi ośrodkami zagranicznymi w Europie:

- Charite – Universitaetsmedizin, Berlin, Niemcy
- Erasmus Universitair Medisch Centrum, Rotterdam, Holandia
- Karolinska Institutet, Sztokholm, Szwecja
- Universitaet Zu Luebeck, Lubeka, Niemcy
- The University Of Birmingham, Birmingham, Wlk. Brytania
- Instytut „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Głównym celem realizowanego projektu jest poprawa leczenia i opieki nad osobami z różnymi chorobami genetycznymi których efektem są zaburzenia hormonalne gonad i nadnerczy (pacjenci m.in. z zespołem Turnera, zespołem Klinefeltera, mieszaną dysgenezją gonad, zespołem niewrażliwości na androgeny, dysgenezją gonad z kariotypem XY i XX, zaburzeniami biosyntezy androgenów, wrodzonym przerostem nadnerczy i spodziectwem). Przeprowadzono ocenę stanu fizycznego i psychicznego uczestników. Skoncentrowano się na ocenie stopnia satysfakcji z dotychczasowego leczenia osób z ZRP. Umożliwiło to poznanie poglądu osób z tymi rzadkimi i mało poznanymi zaburzeniami na temat tego, w jaki sposób społeczeństwo i w szczególności pracownicy opieki zdrowotnej, odnoszą się do ich choroby. Konsekwencją tych badań będzie edukacja lekarzy,

pielęgniarek, nauczycieli i całego społeczeństwa na temat potrzeb i sposobu opieki nad osobami z tymi rzadkimi zaburzeniami poprzez stworzenie wiarygodnych materiałów informacyjnych.

W latach 2001-2002, brałam udział jako wykonawca w Grancie Prezydenta Miasta Łodzi (*Potencjał płodności u mężczyzn zdrowych ochotników i mężczyzn z niepłodnych małżeństw regionu łódzkiego; Załącznik 4, poz. II I, 5; kierownik prof. dr hab. med. Krzysztof Kula*). W badaniu dokonano retrospektywnej analizy 3635 wyników badań nasienia, wykonanych u mężczyzn z niepłodnych małżeństw regionu łódzkiego w latach 1982-2000 w laboratorium Zakładu Andrologii i Endokrynologii Płodności. Analizowano wartości różnych parametrów badania nasienia oraz badano częstość występowania azoospermii (brak plemników w nasieniu) i normozoospermii wśród badanych mężczyzn w kolejnych latach, a także częstość występowania żyłaków powrózka nasiennego. W badaniu wykazano obniżenie odsetka plemników o prawidłowej budowie na przełomie lat 1990-2000, ustalono również, że u 20% młodych mężczyzn występuje obniżona liczba plemników w nasieniu, a także niższy odsetek plemników wykazujących ruch, przy zastosowaniu obowiązujących w tym okresie norm WHO. Wykazano ponadto, że w pięcioleciu 1996-2000 mężczyźni z niepłodnych par wykazywali lepsze wyniki badania nasienia niż mężczyźni zgłaszający się w latach 1982-1986. Nie wykazano natomiast znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy częstością występowania żyłaków powrózka nasiennego przy oligozoospermii (44,4%) i przy normozoospermii (38,0%). Rezultaty pracy opisano w dwóch pracach magisterskich na Wydziale Zdrowia Publicznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W latach 2005-2006 brałam udział jako wykonawca w Grancie Prezydenta Miasta Łodzi (*Ocena ryzyka i przyczyn rozwoju zaburzeń metabolicznych sprzyjających starzeniu się mężczyzn mieszkańców Łodzi, ze szczególnym uwzględnieniem grupy wiekowej 20-39 lat; Załącznik 4, poz. II I, 5; kierownik: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczler*). Celem projektu była ocena wpływu stylu życia na stan zdrowia fizycznego, psychicznego i seksualnego młodych mężczyzn. Wykazano, że u młodych mężczyzn z aglomeracji łódzkiej, w porównaniu z innymi regionami Polski, obserwuje się zwiększoną częstość występowania czynników ryzyka miażdżycy oraz zmniejszanie indeksu wolnego testosteronu co spowodowało, że łagodna postać zaburzeń erekcji występuje znacznie częściej niż publikowano dotychczas co stanowi potencjalne zagrożenie rozwojem cięższych postaci zaburzeń erekcji u starszych mężczyzn. Badania wskazują, że u zdrowych, młodych mężczyzn (20-39 lat) niskie stężenie lipidów we krwi może wpływać

na samopoczucie, podczas gdy obniżone stężenie testosteronu powoduje obniżenie samopoczucia u mężczyzn starszych (40-49 lat), ponadto wpływ hormonów płciowych na kości może zależeć od wieku i stężenia krążącego we krwi biodostępnego estradiolu i testosteronu.

W latach 2005-2008 uczestniczyłam jako wykonawca w dwóch pracach własnych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (*Badanie stanu czynnościowego komórek Sertolego i Leydiga w zespole dysgenetycznych jąder; Załącznik 4, poz. II I, 11*; kierownik: prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer oraz *Badanie stanu czynnościowego komórek Sertolego i Leydiga przy jawnych nowotworach jądra z komórek płciowych; Załącznik 4, poz. II I, 12*; kierownik: dr n. med. Elżbieta Oszukowska). Celem projektów było zbadanie, czy występowanie zmian nowotworowych, takich jak jawne guzy wywodzące się z płodowych komórek płciowych – GCT (ang. *germ cell tumor*) lub stan przednowotworowy w postaci wewnątrzkanalikowego nowotworu jądra (*carcinoma in situ* – CIS), ma związek z występowaniem zaburzeń spermatogenezy lub cech dysgenezy jąder (m.in. w postaci zaburzenia czynności komórek Sertolego i Leydiga) u osób z grup zagrożenia TGCT. Wyniki uzyskane w efekcie projektu pozwoliły ustalić, że grupą najwyższego ryzyka nowotworowego są mężczyźni z już rozpoznany TGCT w jądrze przeciwległym, ale nie jest to związane z częstszym występowaniem cech dysgenezy. W jądrach mężczyzn z ryzykiem TGCT często występują zaburzenia spermatogenezy. Przy zaburzeniach spermatogenezy znamienne częściej pojawiają się cechy dysgenezy gonady, takie jak: obecność niedojrzałych komórek Sertolego, zmniejszona średnica kanalików plemnikotwórczych, zwiększona grubość błony kanalikowej i zwiększone przestrzenie międzykanalikowe, ale nie wykazują one związku z nowotworzeniem. Zmiany nowotworowe pojawiają się tylko przy zaburzonej spermatogenezie i wydaje się, że wykrycie zaburzeń spermatogenezy w biopsjach z jąder jest lepszym wskaźnikiem w przewidywaniu wystąpienia TGCT niż stwierdzenie cech dysgenezy jądra.

W latach 2011-2016 uczestniczyłam jako wykonawca w dwóch projektach naukowych dla młodych pracowników nauki i studentów studiów doktoranckich Uniwersytetu Medycznego w Łodzi kierowanych przez dr n. med. Elizę Filipiak (*Badania zależności parametrów nasienia od czynników środowiskowych i stylu życia; Załącznik 4, poz. II I, 15* oraz *Ocena korelacji ruchliwości plemników ocenianej metodą wspomaganą komputerowo i innych parametrów nasienia z koncentracją fruktozy oraz alfa-glukozydazy obojętnej w nasieniu; załącznik 4, poz. II I, 16*). W wyniku tych badań przeprowadzono analizę parametrów nasienia w połączeniu z oceną występowania leukocytów i komórek

okrągłych i oceną mikrobiologiczną nasienia u 480 pacjentów. Skorelowano wyniki z wiekiem pacjentów wykazując znaczący wpływ wieku na jakość nasienia.

Efekty mojej dotychczasowej pracy naukowej obejmują współautorstwo 26 publikacji oryginalnych, w tym 21 w czasopiśmie naukowych posiadających Impact Factor, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz 11 publikacji poglądowych. Sumaryczny IF według roku publikacji wynosi **35,996** (w tym **14,607** przypada na prace oryginalne z pierwszym autorstwem), a suma punktów MNiSW wynosi **498** (w tym **186** przypada na prace oryginalne z pierwszym autorstwem). Indeks Hirscha wynosi **6** (WoS Core Collection). Łącznie liczba cytowań prac wynosi **76** bez autocytowań (WoS Core Collection z dnia 16.02.2017 r.)

Brałam udział w 17 projektach badawczych, w tym:

- pięciu krajowych finansowanych ze środków zewnętrznych (w 1 jako główny wykonawca, w 4 jako wykonawca): Grant MNiSW (1); Grant NCN (2); Grant Prezydenta Miasta Łodzi (2);
- dwóch zagranicznych: Grant Komisji Europejskiej (5FP i 7FP, jako wykonawca)
- dziesięciu finansowanych ze środków MNiSW na działalność statutową tzw. prace własne UM (w 1 jako kierownik i w 7 jako wykonawca).

Za swoją działalność naukową zostałam kilkakrotnie nagrodzona przez Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nagrodą dla Nauczycieli Akademickich za osiągnięcia naukowe (2011, 2012 – nagroda zespołowa I stopnia; 2013 – nagroda zespołowa II stopnia; 2014 - nagroda zespołowa III stopnia). Sześć prezentacji zjazdowych, których byłam współautorem otrzymało wyróżnienia i nagrody przyznawane przez Komitety Naukowe sympozjów. Jeden artykuł oryginalny, którego jestem współautorem został nagrodzone przez Towarzystwo Naukowe: 2008 – Nagroda Młodych Polskiego Towarzystwa Andrologicznego. Jedna z moich prac została nagrodzona w ramach programu oceny prac naukowych wykorzystujących produkty Santa Cruse Biotechnology (USA): 2011 – Santa Cruse Investigator Award.

Pełny wykaz opublikowanych prac naukowych oraz prac prezentowanych na konferencjach zagranicznych i krajowych, a także informacje dotyczące osiągnięć

dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zamieszczone zostały w załączniku nr 4.

Łódź, dnia 27.03.2017 r.

Kataryna Marchlewska